



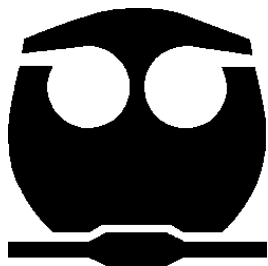
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EFFECTO DE LA INGESTIÓN A CORTO PLAZO
DE EDULCORANTES
NATURALES Y ARTIFICIALES EN
UN MODELO ANIMAL**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA:



ANA ELENA NIETO BEJARANO

MÉXICO, D. F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	M en C. Lucía Cornejo Barrera
Vocal	Q.F.B. Juan Diego Ortiz Palma Pérez
Secretario	M en C. Rolando Salvador García Gómez
Primer suplente	M en I. Landy Irene Ramírez Burgos
Segundo suplente	Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Sitio en donde se desarrolló el tema:

- LABORATORIOS 301, 302, 303 DE INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL Y DE QUÍMICA AMBIENTAL (LIQAyQA) DEL CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
- UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL (UNEXA), DEL CONJUNTO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
- LABORATORIO DE FISIOLÓGÍA DE LA NUTRICIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN “SALVADOR ZUBIRÁN” (INCMyNSZ)

Asesor del Tema:

M. en C. Rolando Salvador García Gómez

Supervisor Técnico:

Dra.- Ing. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa

Sustentante:

ANA ELENA NIETO BEJARANO

RECONOCIMIENTOS

Doy gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme ser parte de esta institución y brindarme todas las herramientas para formarme como una profesionalista exitosa por lo que siempre le estaré agradecida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento de esta investigación a través del Proyecto Clave 178656 “Efecto de diferentes edulcorantes sobre la liberación de las incretinas GLP-1 y GIP y su efecto sobre la lipogénesis a corto y largo plazo”

A la Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa por permitirme estar en su grupo de investigación y por guiarme con sus comentarios y recomendaciones.

Al M. en C. Rolando García Gómez por su orientación, entrega, compromiso y ayuda en todo momento para lograr la realización del estudio en cuestión.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMyNSZ) al Depto. de Fisiología de la Nutrición, en especial a la Dra. Nimbe Torres y al Dr. Armando Tovar por la asesoría, la información proporcionada, pero sobre todo el apoyo en la construcción y desarrollo del proyecto. Un reconocimiento especial también para el QFB Guillermo Ordaz, por su dedicación y enorme compromiso institucional.

Al personal de la Unidad de Experimentación Animal (Unexa) del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM, especialmente: a la MVZ Lucía Macías Rosales por su apoyo y asesoría en el manejo de los animales y el constante seguimiento que le dio al proyecto y al M en C. Héctor Ariel Rico Morales por su aportación en cuanto al tiempo brindado durante el sacrificio y conocimientos esenciales durante la recopilación de las muestras sanguíneas.

DEDICATORIAS

Mamá, te dedico el presente trabajo como tributo a tu apoyo incondicional, porque has sido, eres y siempre serás la persona a la que más admiro, entre muchas cosas por tu espíritu de lucha y superación. Gracias, porque haces todo posible, transformas pensamientos y me animas a seguir adelante y ser mejor.

A mi familia, porque es lo mejor que me pudo haber pasado, gracias por compartir conmigo la vida, los amo. En especial a Valeria Nieto, por inspirar en mí disciplina y hacerme ver que la práctica hace al maestro, a Carlos A. Nieto, por inspirar en mí la persecución de mis sueños y a evitar el conformismo y a Avelardo Nieto, por inspirarme a buscar aquello que me apasione e ir tras eso.

A mis amigos, Diana Castañeda, Abril Gijbers, Andrea Castellanos, Luis Montané, Hannia Barrios, Luciana Puebla, y en especial a Mónica Pedraza Jasso, gracias por su amistad, los buenos consejos, la compañía y por brindarme los mejores momentos que siempre recordaré.

A Evodio G. Álvarez, comparto contigo el éxito y te dedico este trabajo porque contribuiste de manera significativa en la obtención de mi carrera profesional. Gracias por compartir conmigo estos años llenos de aprendizaje y de experiencias inolvidables.

A todos mis profesores, por compartir conmigo su sabiduría, por exigir de mí siempre un esfuerzo extra, y por ser excelentes mentores. En especial a la QA Verónica Hernández Briones, QFB Ruth Martín Fuentes, M. en C. Argelia Sánchez Chinchillas, M en C. Benajmín Ruiz Loyola, M. en C. Rolando García Gómez y a la Dra. Carmen Durán Domínguez de Bazúa.

ÍNDICE

	Página
GLOSARIO	1
RESUMEN	6
CAPÍTULO 1 PROBLEMÁTICA	7
1.1	Introducción 7
1.2	Hipótesis 8
1.3	Objetivos 9
1.3.1	Objetivo general 9
1.3.2	Objetivos particulares 9
CAPÍTULO 2 FUNDAMENTOS	10
2.1	Hormonas intestinales 10
2.1.1	Hormonas incretinas 10
2.1.1.1	Hormona GIP (<i>glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>) 11
2.1.1.1.1	Síntesis y secreción de la hormona GIP 11
2.1.1.1.2	Acción de GIP (<i>glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>) 11
2.1.1.1.3	Receptor de GIP (<i>glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>) 11
2.1.1.1.4	Acción de GIP (<i>glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>) en el páncreas 12
2.1.1.1.5	Efectos extra pancreáticos de la hormona GIP (<i>glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>) 12
2.1.1.1.6	Degradación de la hormona GIP (<i>glucose-dependent insulintropic polypeptide</i>) 13
2.1.1.2	Hormona GLP-1(<i>glucagon-like peptide-1</i>) 13
2.1.1.2.1	Síntesis y secreción de la hormona GLP-1(<i>glucagon-like peptide-1</i>) 13
2.1.1.2.2	Acción de GLP-1 (<i>glucagon-like peptide-1</i>) 14
2.1.1.2.3	Receptor de GLP-1 (<i>glucagon-like peptide-1</i>) 14
2.1.1.2.4	Acción de GLP-1 (<i>glucagon-like peptide-1</i>) en el páncreas 14
2.1.1.2.5	Efectos extra pancreáticos de la hormona GLP-1 (<i>glucagon-like peptide-1</i>) 14
2.1.1.2.6	Degradación de la hormona GLP-1 (<i>glucagon-like peptide-1</i>) 15
2.2	Mecanismo biológico del sabor en los mamíferos 15
2.2.1	Receptores del gusto dulce en los mamíferos 15
2.3	Mecanismo de regulación de la proteína transportadora de glucosa SGLT-1 (<i>Sodium-glucose-transporter-protein-1</i>) 17
2.4	Edulcorantes 19
2.4.1	Edulcorantes naturales 19
2.4.1.1	Sacarosa 19
2.4.1.2	Fructosa 19
2.4.1.3	Stevia 19
2.4.2	Edulcorantes artificiales 20
2.4.2.1	Aspartame 20
2.4.2.2	Acesulfame 21
2.4.2.3	Mezcla de acesulfame con aspartame 22
2.4.2.4	Sucralosa 22
2.4.2.5	Sacarina 23
2.5	Investigaciones sobre estos edulcorantes 23

	Página	
CAPÍTULO 3	METODOLOGÍA PROPUESTA DURANTE EL DESARROLLO EXPERIMENTAL	25
3.1	Descripción detallada de la metodología	26
3.1.1	Solicitud de los especímenes para la experimentación	26
3.1.2	Preparación de las jaulas de recepción	26
3.1.3	Llegada y acondicionamiento de los especímenes a la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química, UNAM	26
3.1.4	Distribución de los especímenes mediante el método de la culebra japonesa	27
3.1.5	Bebida y alimento proporcionados	28
3.1.6	Condiciones para llevar a cabo la toma de muestra sanguínea	29
3.1.7	Anestesia empleando la cámara de CO₂	31
3.1.8	Toma de muestra sanguínea vía ocular	32
3.1.9	Traslado de las muestras y análisis bioquímico	33
3.1.10	Análisis estadístico	33
CAPÍTULO 4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1	Determinación del alimento ingerido	34
4.2	Determinación de la ingesta de bebidas endulzadas	38
4.3	Determinación de la ganancia en masa corporal de las ratas	43
4.4	Hallazgos bioquímicos	47
4.4.1	Determinación de la hormona GIP (<i>glucose-dependent-insulinotropic polypeptide</i>) en plasma sanguíneo de ratas jóvenes	48
4.4.2	Determinación de insulina en plasma sanguíneo de ratas jóvenes	58
4.4.3	Determinación de glucosa en plasma sanguíneo de ratas jóvenes	62
4.4.4	Determinación de triglicéridos en plasma sanguíneo de ratas jóvenes	67
4.4.5	Determinación de colesterol en plasma sanguíneo de ratas jóvenes	71
CAPÍTULO 5	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	76
5.1	Conclusiones	76
5.2	Recomendaciones	79
	ANEXOS	
ANEXO 1	Fundamento de las determinaciones bioquímicas	81
	I- Principio y metodología para la determinación de la hormona GIP (<i>glucose-dependent-insulinotropic-polypeptide</i>)	81
	II- Principio y metodología para la determinación de insulina	90
	III- Principio de la determinación de glucosa	97
	IV- Principio y metodología para la determinación de triglicéridos y colesterol	101
ANEXO 2	I- Datos de cada espécimen por día de su masa y del alimento y bebida ingeridos	106
	BIBLIOGRAFÍA	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1	Condiciones y tiempos utilizados el día de toma de muestra	31
Tabla 4.1	Promedio de alimento ingerido en gramos por cada grupo de edulcorante por día	34
Tabla 4.2	Análisis de varianza del alimento ingerido a dos factores con un 95.0% de confianza	35
Tabla 4.3	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) del alimento ingerido por grupos de edulcorantes, resultados con diferencia estadística significativa	36
Tabla 4.4	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) del alimento ingerido por día	37
Tabla 4.5	Promedio de bebidas ingeridas en mililitros por los grupos de edulcorantes por día	39
Tabla 4.6	Análisis de varianza de la bebida ingerida a dos factores al 95% de confianza	40
Tabla 4.7	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) de la bebida ingerida por grupos de edulcorantes, datos con diferencia estadística significativa	42
Tabla 4.8	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) de la bebida ingerida por día	42
Tabla 4.9	Promedio de la masa de las ratas en gramos de los grupos de edulcorantes por día	44
Tabla 4.10	Promedio de incrementos de masa en gramos de las ratas de los grupos de edulcorantes por día	45
Tabla 4.11	Análisis de varianza del incremento de masa a dos factores con un 95.0% de confianza	46
Tabla 4.12	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) de incrementos de masa por día	47
Tabla 4.13	Promedio de la concentración en plasma de GIP total en las condiciones ayuno y edulcorante (pmol/L)	48
Tabla 4.14	Análisis de varianza de GIP condición edulcorante con un 95.0% de confianza	49
Tabla 4.15	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) de GIP por edulcorante	52
Tabla 4.16	Promedio de la concentración en plasma de GIP total en la condición comida y el promedio de gramos de alimento ingeridos (pmol/L)	53
Tabla 4.17	Promedio de la concentración en plasma de GIP total en la condición comida con edulcorante y el promedio de gramos de alimento ingeridos (pmol/L)	54
Tabla 4.18	Promedio de la concentración de GIP total por gramo de alimento ingerido en las condiciones comida y edulcorante con comida (pmol/Lg)	55
Tabla 4.19	Análisis de varianza de GIP por gramo de alimento a dos factores con un 95.0% de confianza	57
Tabla 4.20	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) de GIP por edulcorante	58

Tabla 4.21	Promedio de la concentración en plasma de insulina en las condiciones ayuno y edulcorante (ng/mL)	59
Tabla 4.22	Análisis de varianza de insulina condición edulcorante con un 95.0% de confianza	60
Tabla 4.23	Promedio de la concentración de insulina por gramo de alimento ingerido en las condiciones comida y edulcorante con comida (ng/mLg)	61
Tabla 4.24	Análisis de varianza de insulina por gramo de alimento a dos factores con un 95.0% de confianza	62
Tabla 4.25	Promedio de la concentración en plasma de glucosa en las condiciones de ayuno y de edulcorante (mg/dL)	63
Tabla 4.26	Análisis de varianza de glucosa condición edulcorante con un 95.0% de confianza	64
Tabla 4.27	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) de glucosa por edulcorante	64
Tabla 4.28	Promedio de la concentración de glucosa en plasma por gramo de alimento ingerido en las condiciones comida y edulcorante con comida (mg/dLg)	65
Tabla 4.29	Análisis de varianza de glucosa por gramo de alimento a dos factores con 95.0% de confianza	66
Tabla 4.30	Promedio de la concentración de triglicéridos en plasma en las condiciones ayuno y edulcorante (mg/dL)	68
Tabla 4.31	Análisis de varianza de triglicéridos condición edulcorante con un 95.0% de confianza	69
Tabla 4.32	Promedio de la concentración de triglicéridos por gramo de alimento ingerido en las condiciones comida y edulcorante con comida (mg/dLg)	70
Tabla 4.33	Análisis de varianza de triglicéridos por gramo de alimento a dos factores con un 95.0% de confianza	71
Tabla 4.34	Promedio de la concentración en plasma de colesterol en las condiciones ayuno y edulcorante (mmol/L)	71
Tabla 4.35	Análisis de varianza de colesterol condición edulcorante con un 95.0% de confianza	73
Tabla 4.36	Promedio de la concentración de colesterol por gramo de alimento ingerido en las condiciones comida y edulcorante con comida (mmol/Lg)	73
Tabla 4.37	Análisis de varianza de colesterol por gramo de alimento a dos factores con un 95.0% de confianza	74
Tabla 4.38	Diferencia mínima significativa (<i>LSD</i> por sus siglas en inglés) de colesterol por edulcorante	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1.	Receptores del gusto dulce acoplados a proteínas G (GPCRs) y algunos ejemplos de las moléculas con las que interactúan cada uno (Fernstrom et al., 2012)	16
Figura 2.2.	Modelo de la absorción intestinal de glucosa en un enterocito y su interacción con una célula L-enteroendócrina (Brown y Rother, 2012)	18

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1	Promedio de alimento ingerido por cada grupo de edulcorante por día	35
Gráfico 4.2	Promedio de bebidas ingeridas por los grupos de edulcorantes por día	39
Gráfico 4.3	Promedio de la masa de las ratas de los grupos de edulcorantes por día	44
Gráfico 4.4	Promedio de incrementos de masa de las ratas de los grupos de edulcorantes por día	45
Gráfico 4.5	Promedio de la concentración de GIP por edulcorante en las condiciones ayuno y edulcorante	48
Gráfico 4.6	Promedio de la concentración de GIP con respecto al tiempo por grupo de edulcorante en la condición comida	53
Gráfico 4.7	Promedio de la concentración de GIP con respecto al tiempo por edulcorante en la condición comida con edulcorante	55
Gráfico 4.8	Promedio de la concentración de GIP por edulcorante en las condiciones comida y edulcorante con comida	56
Gráfico 4.9	Promedio de la concentración de insulina por edulcorante en las condiciones ayuno y edulcorante	59
Gráfico 4.10	Promedio de la concentración de insulina por edulcorante en las condiciones comida y edulcorante con comida	61
Gráfico 4.11	Promedio de la concentración de glucosa por edulcorante en las condiciones ayuno y edulcorante	63
Gráfico 4.12	Promedio de la concentración de glucosa por edulcorante en las condiciones comida y edulcorante con comida	66
Gráfico 4.13	Promedio de la concentración de triglicéridos por edulcorante en las condiciones ayuno y edulcorante	68
Gráfico 4.14	Promedio de la concentración de triglicéridos por edulcorante en las condiciones comida y edulcorante con comida	70
Gráfico 4.15	Promedio de la concentración de colesterol por edulcorante en las condiciones comida y edulcorante con comida	72
Gráfico 4.16	Promedio de la concentración de colesterol por edulcorante en las condiciones comida y edulcorante con comida	73

ÍNDICE FOTOGRÁFICO

Imagen 3.1	Ratas tomando agua <i>ad libitum</i>	27
Imagen 3.2	Grupo de 10 ratas distribuidas por el método de la “culebra japonesa”	27
Imagen 3.3	“Rack” de jaulas individuales con los bebederos y su identificación independiente	28
Imagen 3.4	Rata en jaula individual con alimento a un costado	29
Imagen 3.5	Cámara de CO ₂ en donde se realizó la anestesia	31
Imagen 3.6	Toma de muestra de sangre vía ocular en tubos tipo <i>Vacutainer</i>	32
Imagen 3.7	Separación del plasma en tubos tipo <i>Vacutainer</i> posterior a la centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos	32

GLOSARIO

Acesulfame de potasio. Edulcorante sintético descubierto en 1967 por Hoechst AG. Se le considera prácticamente libre de calorías ya que según sus fabricantes, no es metabolizado por el cuerpo humano, es decir se elimina por el organismo sin ninguna modificación, además de ser unas 200 veces más dulce que el azúcar.

Ad libitum. En latín, libre acceso. Cuando se trata de la ingestión de alimentos o bebidas se refiere a que no hay ninguna restricción en su consumo.

ADN (ácido desoxirribonucleico). Es un ácido nucleico que contiene instrucciones genéticas usadas en el desarrollo y funcionamiento de todos los organismos vivos conocidos y algunos virus, y es responsable de su transmisión hereditaria.

Agua potable. Agua exenta de contaminación objetable e inocua y que se considera satisfactoria para el consumo humano según la NOM-127-SSA1-1994 de México.

Alimento. Es la sustancia que se ingiere, bebe y se absorbe por cualquier ser vivo ya que el término alimento incluye también bebidas líquidas, como la leche. Los alimentos son la principal fuente de energía y nutrición de animales, siendo considerados generalmente aquellos de origen animal o vegetal.

AMPc (*Adenosine monophosphate cyclic, en inglés*). Adenosín monofosfato cíclico, en español, es un nucleótido que funciona como segundo mensajero en varios procesos biológicos. Es un derivado del adenosín trifosfato (ATP), y se produce mediante la acción de la enzima adenilato ciclasa a partir del adenosín trifosfato.

Anaquele rodante para jaulas de animales modelo (*rack en inglés*). Anaqueles de rejillas metálicas con láminas puestas horizontalmente sobre ruedas, para colocar sobre ellas jaulas individuales de animales de laboratorio.

Andeva (*Anova*). Análisis de varianza, ANOVA por sus siglas en inglés (*Analysis of Variance*)

Aspartame. Es el nombre de un edulcorante artificial, *Aspartil-fenilalanina-1-metil-éster*; resulta de la unión de dos aminoácidos, el ácido aspártico y la fenilalanina.

Caloría. Unidad de energía térmica equivalente a la cantidad de calor necesaria para elevar la temperatura de un gramo de agua en un grado centígrado, de 14.5 a 15.5°C, a la presión normal; equivale a 4.185 J.

CCK (*Cholecystokinin, en inglés*). Hormona producida en el intestino delgado, su función es estimular la producción de enzimas del páncreas y de bilis almacenada en la vesícula biliar.

Células beta. Las células beta son un tipo de célula del páncreas localizadas en los *islotos de Langerhans*. Sintetizan y segregan la insulina.

Células enteroendócrinas. Este tipo de hormonas se encuentran presentes en la mayor parte del aparato digestivo, en los islotes pancreáticos e incluso en las vías biliares, y son responsables de la secreción de las hormonas gastrointestinales y de las sustancias parácrinas.

Colesterol. Lípido natural (esterol) que el cuerpo necesita para formar hormonas, vitamina D y ácidos biliares. Se localiza en los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo. Solamente se encuentra en alimentos de origen animal.

Diabetes mellitus. Es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglucemia (aumento de los niveles de glucosa en sangre), resultado de defectos en la secreción de insulina, en su acción o ambas. Se trata de una compleja enfermedad en la que coexiste un trastorno global del metabolismo de los hidratos de carbono de las grasas y de las proteínas. Es considerada como una enfermedad multifactorial por factores implicados en su patogénesis.

Diabetes mellitus tipo 1. Se da en algunas personas propensas a esta enfermedad en la época temprana de su vida y se caracteriza por un déficit absoluto de insulina, dado por la destrucción de las células beta del páncreas por procesos autoinmunes ó idiopáticos.

Diabetes mellitus tipo 2. Se caracteriza por un complejo mecanismo fisiopatológico, que se caracteriza por el déficit relativo de producción de insulina y por una deficiente utilización periférica por los tejidos de glucosa (resistencia a la insulina). Se desarrolla a menudo en etapas adultas de la vida y es muy frecuente su asociación con la obesidad.

Dieta. La dieta es el conjunto de hábitos o comportamientos alimenticios o nutricionales de una persona o población. La dieta forma parte de los estilos de vida de las personas.

DPP-4 (Dipeptidil Peptidasa IV). Es una enzima natural que degrada a las hormonas incretínicas GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) y GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*).

Edulcorantes. Sustancias que endulzan los alimentos o medicamentos. Pueden ser naturales o sintéticos. Entre los naturales se encuentran la sacarosa, la fructosa y los polialcoholes y entre los sintéticos se encuentran la sacarina, el aspartame y la sucralosa, entre otros.

Efecto parácrino. Es un término que se refiere al tipo de comunicación celular por secreción química que afecta a una célula vecina a la célula emisora, como es el caso de muchas hormonas. La sustancia secretada difunde en dirección de los receptores específicos sobre las células adyacentes a la célula que la sintetizó. Es un tipo de comunicación celular que emplea mensajeros químicos.

Energía. El término energía tiene varias acepciones y definiciones, aunque todas ellas dan idea de una capacidad para obrar, transformar y poner algún objeto en movimiento.

Enfermedad. Una enfermedad es cualquier trastorno anormal del cuerpo o la mente que provoca malestar y alteración de las funciones normales.

FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO por sus siglas en inglés (*Food and Agriculture Organization*).

Fructosa. La fructosa es un endulzante natural obtenido de la fruta. Los médicos la han recomendado a los diabéticos porque su metabolismo es diferente al de la glucosa que requiere de insulina para metabolizarla. Es una cetohehexosa (6 átomos de carbono).

Glucosa. Molécula carbohidrogenada de fórmula $C_6H_{12}O_6$, la cual se encuentra formada por una aldohexosa (aldehído pentahidroxilado) y es un monosacárido. La glucosa es el compuesto orgánico más abundante de la naturaleza. Es la fuente principal de energía de las células, mediante la degradación catabólica y es el componente principal de polímeros de importancia estructural como la celulosa y de polímeros de almacenamiento energético como el almidón.

GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide, en inglés*). Hormona gastrointestinal con la capacidad de inducir la secreción de insulina en presencia de concentraciones elevadas de glucosa. Favorece la secreción de GLP-1 desde las células “L” intestinales.

GLP-1 (*glucagon-like peptide-1 en inglés*). Hormona insulínica, la más potente descrita, capaz de regular el apetito al inducir la sensación de saciedad, efecto favorecido por otras acciones que GLP-1 ejerce en el tracto gastrointestinal: inhibe la secreción de ácido gástrico inducida por la ingestión de alimentos, retrasa el vaciamiento gástrico y promueve la distensión gástrica.

GLUT2 (*Glucose transporter type 2, en inglés*). Proteína transportadora transmembrana que posibilita el movimiento pasivo de glucosa a través de las membranas celulares.

GLUT5 (*Glucose transporter type 5, en inglés*). Es un transportador de fructosa expresado en la membrana apical de enterocitos en el intestino delgado. GLUT5 permite a la fructosa ser

transportada desde el lumen intestinal al enterocito por difusión facilitada debido a la alta concentración de fructosa en el lumen intestinal.

GPCR (*G protein-coupled receptors*, en inglés). Los receptores acoplados a proteínas G, también conocidos como receptores transmembrana de siete dominios, y receptores ligados a proteínas G, comprenden una gran familia de proteínas de receptores transmembrana que perciben moléculas afuera de la célula y activan las vías de transducción de señales y, finalmente, las respuestas celulares.

Gustducina. Proteína G heterotrimérica que actúa como mediador en la transducción de una señal extracelular (un ligando) a una señal intracelular (el AMPc).

Hipertensión. Es una condición médica caracterizada por un incremento continuo de las cifras de presión arterial por encima de 139/89mmHg y considerada uno de los problemas más importantes de salud pública en países desarrollados, afectando a cerca de mil millones de personas a nivel mundial. La hipertensión es una enfermedad asintomática y fácil de detectar; sin embargo, lleva a complicaciones graves y letales si no se trata a tiempo.

Hormonas incretinas. Conjunto de hormonas que se producen en el intestino en respuesta a la ingesta de alimentos. Uno de sus efectos más importantes es la secreción de insulina por el páncreas y la disminución en los niveles de glucosa en sangre.

Durante el ayuno, las concentraciones de GIP se mantienen bajas. La ingestión de glucosa o lípidos desencadena la secreción de la Hormona GIP y se produce un incremento en su concentración plasmática, hecho que favorece la secreción de GLP-1 desde las células L intestinales. De esta manera, ambas hormonas promueven la secreción de insulina desde los islotes de Langerhans de las células beta en lo que se conoce como mecanismo incretina.

IG (Índice glucémico). Es un sistema de clasificación de hidratos de carbono basado en su efecto inmediato en los niveles de glucosa en la sangre. Esta escala compara los hidratos de carbono gramo a gramo en comidas individuales, proporcionando un índice numérico respaldado por pruebas de glucemia posterior a la comida.

Ingesta diaria admisible (IDA). Cantidad aceptada como inocua internacionalmente de alguna sustancia química (*ADI*, por sus siglas en inglés, *Acceptable Daily Intake*).

Islotes de Langerhans. También llamados islotes pancreáticos, son unos cúmulos de células que se encargan de producir hormonas como la insulina y el glucagón, con función netamente endocrina.

Insulina. Es una hormona polipeptídica formada por 51 aminoácidos. Esta hormona es segregada por las células beta de los grupos de Langerhans del páncreas, interviene en el aprovechamiento metabólico de los nutrientes, sobre todo con el anabolismo de los hidratos de carbono. Su déficit provoca la diabetes mellitus.

JECFA. Del inglés *Joint Experts Committee on Food Additives*, Comité Mixto *FAO/OMS* de Expertos en Aditivos Alimentarios.

Lípidos o grasas. Son la fuente de energía de largo plazo para el cuerpo y para los vegetales. Químicamente son productos que contienen ácidos grasos, que pueden ser saturados o insaturados, lo que tiene importante efecto en la salud. Pueden ser sólidos (como la mantequilla, el queso, etc.) o líquidos como el aceite vegetal.

LSD. Diferencias mínimas significativas por sus siglas en inglés (*least square difference*). Es la diferencia entre dos medias, basada en la prueba *t* de Student, empleando el valor de la varianza del error. El valor de la DMS o *LSD* se encuentra referido a la distribución de *t*.

mc. Subíndice usado para designar masa corporal.

Membrana apical. Membrana celular que mira hacia la luz intestinal, y que presenta microvellos.

Membrana basolateral. Membrana celular que mira hacia el espacio intracelular, los capilares sanguíneos y linfáticos.

Obesidad. La obesidad es un exceso de grasa en el cuerpo que frecuentemente condiciona una alteración del estado de la salud. Es un factor de riesgo conocido para enfermedades crónicas como: enfermedades cardíacas, diabetes, hipertensión arterial y algunas formas de cáncer. La evidencia sugiere que se trata de una enfermedad con origen multifactorial: genético, ambiental y psicológico, entre otros.

PKA (*Protein kinase A*, en inglés). La proteína quinasa A, es parte de una familia de enzimas cuya actividad depende de la concentración de AMPc (adenosín monofosfato cíclico). Por eso, la PKA es también conocida como proteína cinasa dependiente del cAMP y tiene una infinidad de funciones en la célula, incluyendo la regulación del metabolismo del glucógeno, glucosa y lípidos. Esto es importante en la regulación del ciclo celular. Cataliza la reacción de fosforilación de una proteína.

Poder edulcorante. Es la capacidad de una sustancia para causar la sensación de dulzor, dicha sensación se mide subjetivamente tomando como base de comparación la sacarosa, a la que se le da un valor arbitrario de 1 o de 100. Es decir, si un compuesto tiene un poder edulcorante de 2 (1 para la sacarosa), indica que es 100% más dulce que el disacárido.

Postprandial. Que tiene lugar después de una comida. Condición de un individuo después de haber ingerido alimento, se caracteriza por activar procesos metabólicos para llevar a cabo la digestión.

Proteína G heterotrimérica. Proteína transmembranal compuesta de tres monómeros (α , β y γ). En la fisiología celular actúan como interruptores biológicos mediante la transducción de señales.

PYY (*Peptid tyrosine tyrosine*, en inglés). Es un polipéptido producido en las células PP del páncreas. Tiene efecto sobre los niveles de glucógeno hepático y secreciones gastrointestinales.

Rack. Véase anaquel rodante para jaulas de animales modelo.

Receptor heteromérico. Receptor conformado de subunidades o monómeros de distinta composición.

Sacarina. Es un edulcorante 300 veces más dulce que el azúcar. Tiene un regusto un poco amargo. Se asocia junto con otros endulzantes artificiales

Sacarosa. Su nombre común es azúcar. Proviene de la caña de azúcar y de la remolacha, así como de algunas frutas y de la miel. Formada por la unión de una molécula de glucosa y una de fructosa. Es disacárido y es no reductor a diferencia de los demás mono y disacáridos que son reductores. La fórmula empírica de este disacárido es $C_{12}H_{22}O_{11}$

SGLT-1 (*Sodium glucose transporter protein*, en inglés). Es un cotransportador activo de alta afinidad por glucosa y galactosa, se encuentra en células de la membrana apical. Transporta 2 Na^+ por cada molécula de glucosa.

Síndrome metabólico. Se denomina síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas constituido por la obesidad de distribución central, la disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (*HDL*, por sus siglas en inglés, *high density lipoproteins*), la elevación de las concentraciones de triglicéridos, el aumento de la presión arterial (PA) y la hiperglucemia.

Stevia. Es un género de plantas fanerógamas perteneciente a la familia de las asteráceas. Una de sus especies, conocida como *Stevia rebaudiana*, de origen sudamericano ha sido cultivada y utilizada como edulcorante, ya que es entre 30 y 45 veces más dulce que la sacarosa.

Sucralosa. Es el único edulcorante de alta intensidad que está hecho a partir de azúcar al clorar la molécula y sustituir hidrógenos por cloros. Su sabor es similar al de la sacarosa pero su

dulzor es aproximadamente 600 veces mayor. El efecto de esos átomos de cloro en la salud no se conoce todavía.

Sustancias paracrinas (paracrino). Secreción paracrina se refiere a un tipo de comunicación celular por secreción química que afecta a una célula vecina de la célula emisora, como es el caso de muchas hormonas.

Tejido adiposo (adipocitos). Elemento celular que tiene como característica acumulación y fusión de pequeñas gotas de grasa dentro del citoplasma. El tejido adiposo cumple funciones estructurales y una de ellas es servir como amortiguador, protegiendo y manteniendo en su lugar los órganos internos así como a otras estructuras más externas del cuerpo.

TG (Triglicéridos). Es el nombre que se le da a las grasas saturadas en los análisis clínicos

TRC (Taste receptor cells, en inglés). Las células receptoras del gusto, son células epiteliales especializadas con muchas propiedades neuronales incluyendo la habilidad de despolarizar y formar sinapsis. Las TRC en la boca se encuentran típicamente aglomeradas en grupos de aproximadamente 100 células. La superficie apical de las TRC, que hace contacto con la cavidad oral, es rica en microvellosidades complejas que contienen los receptores GPCR (Ver GPCR).

Nota: Esta tesis usa el punto decimal, de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana correspondiente (DOF, 2009)

RESUMEN

En la actualidad, uno de los problemas de salud más graves que atañe al país y a países desarrollados es el de la obesidad. Entre las causas asociadas atribuibles a esta enfermedad se cuenta con un importante aumento calórico y a un gasto energético bajo. Entre los alimentos que pudieran estar contribuyendo a este desorden alimenticio se tienen a los edulcorantes no calóricos y algunos de los calóricos encontrados en muchos alimentos adicionados generalmente con el objetivo de conferir de dulzor a los alimentos y bebidas. Es por lo anterior que resulta imperante determinar si el consumo de edulcorantes calóricos en la amplia gama de productos alimenticios se encuentra o no ligada a los problemas de sobrepeso, analizando paralelamente los efectos propios de los edulcorantes no calóricos y la relación de ambos con el problema de la obesidad. Enfocados en esta problemática, el objetivo de esta investigación fue el de evaluar en un estudio a corto plazo (siete días) el efecto metabólico de 8 distintos edulcorantes (fructosa, sacarosa, sucralosa, aspartame, acesulfame de potasio, sacarina, mezcla de aspartame y acesulfame y finalmente la stevia) incluyéndolos en la bebida de 90 ratas Wistar machos con una masa entre los 125 a 150g bajo un horario restringido de 9:00 a 15:00 horas, restringiendo en el mismo horario el suministro de alimento. En el octavo día de experimentación, una muestra de sangre de cada espécimen fue tomada vía ocular treinta minutos después de suministrarles los edulcorantes bajo tres distintas condiciones: a) Una carga de edulcorante suministrada oralmente, b) Suministro de la carga del edulcorante tras ingesta de comida y c) Suministro de comida y ningún edulcorante, teniéndose únicamente como blanco ó condición de ayuno a una rata a la cual se le suministró solamente agua purificada. Con el plasma sanguíneo obtenido de cada rata de cada condición, se determinaron los parámetros bioquímicos de glucosa, triglicéridos, colesterol, la hormona GIP (*glucose-dependent insulinotropic polypeptide*, por sus siglas en inglés) e insulina. La hormona GIP es una hormona que se sintetiza y se libera en el intestino delgado tras ingerir hidratos de carbono o lípidos fundamentalmente, y es la hormona que estimula en mayor medida la liberación de la hormona insulina. En la literatura se reporta que como respuesta a la ingesta de una comida puede elevarse la concentración en plasma de GIP de 10 a 20 veces. Entre los resultados sobresalientes se encontró que los edulcorantes artificiales sucralosa y mezcla (acesulfame con aspartame) aumentaron modesta pero significativamente la secreción de la hormona GIP (75 y 65pmol/L), esto con respecto al grupo control (27pmol/L) *in vivo*. Este hecho, ayudó a la comprobación de que si bien la sucralosa no fue absorbida en el organismo del roedor, es posible que pueda causar un efecto metabólico (como lo es la secreción de GIP) cuando es suministrada en altas concentraciones (1.22g/kgmc). Lo anterior se ha relacionado con estudios previos que vinculan los receptores del sabor dulce que se encuentran en regiones del tracto gastrointestinal y con la secreción de las hormonas incretinas (GIP) tanto en seres humanos como en roedores, por lo que esta investigación da pauta de continuar con la investigación sobre los efectos metabólicos y su alcance en la nutrición no sólo del roedor, sino también del ser humano.

CAPÍTULO 1. PROBLEMÁTICA

1.1 INTRODUCCIÓN

En la historia de la humanidad siempre ha prevalecido el consumo de alimentos dulces como las frutas, la leche o la miel, pero no fue hasta el apogeo de las plantaciones azucareras, en el siglo XVII, cuando los edulcorantes se introdujeron como parte de nuestra cultura alimentaria y a transformarse en un acompañante casi universal de un gran número de productos cotidianos como el pan, las bebidas como el té, los postres y los dulces, siendo a partir de los años sesenta del siglo XX que se comenzaron a comercializar otros edulcorantes como la sacarina, la fructosa y el aspartame, por citar solo a algunos de ellos (Adams *et al.*, 2008).

Lo anterior ha tenido repercusiones tanto en los hábitos alimenticios de la población como en la salud, muestra de ello son los problemas de obesidad que aquejan a la población en general a nivel global, situación que resulta ser de suma importancia si se toma en consideración que la obesidad es un problema complejo y multifactorial de salud pública, propio tanto de países desarrollados como de aquellos en vías de desarrollo. Entre las causas de obesidad asociadas con la dieta, se atribuye a la ingesta de alimentos con elevado contenido calórico como una causa importante. Según un análisis de datos estadísticos de la FAO, se demuestra que la ingesta de energía alimentaria se ha aumentando de forma sostenida a nivel mundial, llegando a ser de hasta 3,688kcal/persona/día en algunos países industrializados. Se estima que el azúcar (glucosa, fructosa y sacarosa) constituye cerca del 24% de la energía diaria consumida por un adulto dentro de la población de EE.UU. de la cual las bebidas endulzadas calóricamente aportan más del 10% de los requerimientos de energía diarios (FAO *en línea*, 2012).

Las bebidas endulzadas han sido identificadas por algunos investigadores (Adams *et al.*, 2008), como un factor que contribuye a la prevalencia de la obesidad en los Estados Unidos. Asimismo en sus investigaciones aseveran que es la fructosa contenida en la sacarosa (50% de fructosa) y el alto contenido de fructosa del jarabe de maíz (42 a 55% fructosa) lo que contribuye a los efectos del consumo excesivo de bebidas azucaradas para promover el aumento de masa, la desregulación del metabolismo de lípidos y la resistencia a la insulina /intolerancia a la glucosa, entre otros.

Por otro lado, en la última década hubo un explosivo aumento en el número de productos que contienen edulcorantes artificiales no calóricos. Más de 6,000 nuevos productos fueron lanzados al mercado en los Estados Unidos entre 1999 y 2004. Los edulcorantes artificiales son más comúnmente usados en bebidas carbonatadas, pero pueden ser también encontrados en una gran variedad de productos, que van desde comida para bebé (ej. Pedialyte) hasta comida congelada (ej. Lean Pockets). Un reporte de consumo de la empresa IRI declaró que el 65 por ciento de los hogares americanos compraron por lo menos un producto con sucralosa en 2008 (Yang *et al.*, 2010).

Dado el contexto anterior, resulta imperante determinar si la excesiva presencia de edulcorantes calóricos en la amplia gama de productos alimenticios se encuentra o no ligada a los problemas de sobrepeso, analizando paralelamente los efectos propios de los edulcorantes no calóricos y la relación de ambos con la obesidad. Por ello, en la presente investigación las hormonas que fueron determinadas fueron las hormonas incretinas, por ser las hormonas dependientes de glucosa que estimulan la secreción de la hormona insulina; es más, GLP-1 es la hormona insulínica más potente descrita, lo cual significa que es la hormona que estimula con mayor potencia la secreción de la insulina. Por tanto, en la presente investigación se midió la concentración de la hormona GIP (GIP Total, es decir, no se analizó el fragmento de GIP activo) en plasma únicamente bajo algunas condiciones; ya que el manejo de la hormona GLP-1 por su corta vida media en plasma (aproximadamente 2 min), involucra mayores precauciones lo que eleva significativamente el costo de su análisis.

1.2 Hipótesis experimental

Se espera encontrar alguna evidencia de que los edulcorantes calóricos y algunos no calóricos estimulen la secreción de la hormona incretina GIP “*in vivo*”, esperando además corroborar la aseveración de que algunos edulcorantes artificiales modifican la absorción de glucosa.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general de la investigación

Evaluar a corto plazo el efecto fisiológico de 8 distintos edulcorantes (fructosa, sacarosa, sucralosa, aspartame, acesulfame de potasio, sacarina, mezcla de aspartame y acesulfame y stevia) midiendo los parámetros bioquímicos: Glucosa, triglicéridos y las hormonas GIP e insulina, en suero sanguíneo, así como el posible incremento de masa de los especímenes empleados, ratas Wistar machos de 125 a 150g.

1.3.2 Objetivos específicos

- Observar el comportamiento de la ingesta de alimento y su posible relación con la preferencia a la ingesta de los edulcorantes suministrados a las ratas.
- Analizar los incrementos de masa de las ratas buscando diferencias entre los grupos de edulcorantes.
- Comparar los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas contra un control, el cual sólo ingirió agua purificada durante toda la experimentación, buscando diferencias estadísticamente significativas.
- Reunir evidencia que ayude a confirmar la hipótesis planteada por varios autores de que una dieta dulce (incluso aquella que incluye edulcorantes no energéticos como sucralosa) podría propiciar una mayor absorción de glucosa por aumento del transportador celular de glucosa SGLT-1.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS

2.1 Hormonas intestinales

El control de la masa corporal ha suscitado gran interés en el entorno científico desde siempre. En un principio se pensó que el control del apetito era un proceso regulado exclusivamente en el sistema nervioso central. Con el tiempo, se determinó que la regulación de la ingesta no era un proceso exclusivo de este sistema, sino que en él también participaban señales periféricas. Estas señales periféricas llegan al sistema nervioso central mediante vía neuronal (a través del nervio vago) o por vía humoral (como secreciones endocrinas que se vierten al torrente sanguíneo) (Álvarez *et al.*, 2009).

De esta manera, las hormonas intestinales han ocupado una importancia central en las complejas interacciones neuroendocrinas que subyacen la regulación del balance energético, y esto es porque han mostrado actuar directamente sobre neuronas en el hipotálamo y centros del apetito en el tronco cerebral, es decir pueden ser traducidas como una sensación subjetiva de saciedad. Entre las hormonas intestinales anorexigénicas más importantes se encuentran: la colecistocinina (CCK por *Cholecystokinin*, por sus siglas en inglés), el péptido tirosina tirosina (PYY por *Peptid tyrosine tyrosine*, por sus siglas en inglés) y las hormonas incretinas (GIP y GLP-1 por *gastric inhibitory polypeptid* y *glucagon-like peptide-1*, por sus siglas en inglés) (Chaudhri *et al.*, 2006).

2.1.1 Hormonas incretinas

Como describen Juul y Jesper (2004), las hormonas incretinas son hormonas péptidicas secretadas por el intestino delgado que pueden explicar el efecto incretino: esto es, el aumento de la secreción de insulina observado después de una ingesta de glucosa, comparado con el observado después de una administración intravenosa de glucosa (resultando en la misma elevación de glucosa en sangre). Esta diferencia de aumento en la concentración de insulina en un individuo sano puede ser de 3 o 4 veces.

2.1.1.1 Hormona GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*)

2.1.1.1.1 Síntesis y secreción de la hormona GIP (*glucose-dependent-insulintropic polypeptide*)

La hormona GIP (*glucose-dependen-insulintropic-polypeptide*, por sus siglas en inglés) se deriva de un péptido precursor más grande (*pro GIP*), el cual incluye un péptido señal: un péptido N terminal, el péptido GIP y un péptido C terminal. El péptido de GIP bioactivo de 42 aminoácidos es liberado de *pro GIP* a través de una escisión postraduccional en residuos individuales de arginina que flanquean al péptido. Tanto en roedores como en seres humanos, esta hormona GIP es producida y secretada en las células K del intestino delgado (principalmente en el duodeno, aunque también en menor cantidad en el yeyuno e ileón), en las zonas del sistema nervioso central y en la glándula salival submandibular. La ingestión de una comida rica en hidratos de carbono y grasas es un estímulo potente para la secreción de GIP. Esta hormona alcanza niveles pico después de 15 a 30 minutos después de una ingestión oral de glucosa (Hansotia y Drucker, 2005), y como respuesta a la ingesta de una comida puede elevar su concentración en plasma de 10 a 20 veces (Juil y Jesper, 2004).

2.1.1.1.2 Acción de GIP (*glucose-dependent-insulintropic-polypeptide*)

El nombre de la hormona GIP (*glucose-dependent-insulintropic-polypeptide*, por sus siglas en inglés) proviene de la capacidad de inducir la secreción de insulina en presencia de concentraciones elevadas de glucosa (Hansotia y Drucker, 2005).

Durante el ayuno, las concentraciones de GIP se mantienen bajas. La ingestión de glucosa o lípidos desencadena la secreción de la hormona GIP y se produce un incremento en su concentración plasmática, hecho que favorece la secreción de GLP-1 desde las células L intestinales. De esta manera, ambas hormonas promueven la secreción de insulina desde los islotes de Langerhans de las células beta en lo que se conoce como mecanismo incretina. (Álvarez *et al.*, 2009).

2.1.1.1.3 Receptor de GIP (*glucose-dependent-insulintropic-polypeptide*)

El receptor de GIP se clonó originalmente a partir de ADN de la corteza cerebral de rata. Este receptor es expresado en el páncreas, estómago, intestino delgado, tejido adiposo, pulmón,

corazón, hueso, endotelio vascular y varias regiones del cerebro. El receptor de GIP pertenece a la súper familia de receptores acoplados a proteínas “G” ó GPCR (*G protein-coupled receptors*, en inglés) así como el receptor de GLP-1 y se encuentra positivamente acoplado a la activación de adenilato ciclasa, e incrementa el Ca^{2+} intracelular (Hansotia y Drucker, 2005).

En los adipocitos, se ha detectado una amplia presencia de receptores de GIP y se sabe que en el tejido adiposo GIP estimula de forma dosis dependiente la actividad de la lipoproteinlipasa (enzima que actúa en las lipoproteínas) inactivando la lipólisis inducida por el glucagón, aumentándose consecuentemente el efecto lipogénico de la insulina, con lo cual se favorece la formación de ácidos grasos, especialmente en el tejido adiposo omental¹ (Álvarez *et al.*, 2009).

2.1.1.1.4 Acción de GIP (*glucose-dependent-insulinotropic-polypeptide*) en el páncreas

GIP es liberado por las células K del intestino y aumenta la secreción de insulina estimulada por glucosa. Los mecanismos por los cuales GIP estimula la secreción de insulina son similares a aquellos identificados para GLP-1 que incluyen la elevación de AMPc (*Adenosine monophosphate cyclic*, en inglés), inhiben el canal de K^+ ATP (Que transporta K^+ de forma activa) y aumentan el Ca^{2+} intracelular. Las vías de señalización que median las acciones insulínótropicas de GIP incluyen mecanismos tanto dependientes como independientes de la PKA (*Protein kinase A*, en inglés) (Hansotia y Drucker, 2005).

GIP además de ejercer efectos antiapoptóticos (que previene un tipo de muerte celular) inducen el crecimiento de las células beta en el páncreas (Álvarez *et al.*, 2009).

2.1.1.1.5 Efectos extra pancreáticos de la hormona GIP (*glucose-dependent insulinotropic-polypeptide*)

GIP es una hormona anabólica para el metabolismo lipídico de los adipocitos, estimula además la actividad de la lipasa lipoproteínica, promoviendo así el almacenamiento de grasa en el adipocito. GIP también promueve la incorporación de ácido graso al tejido adiposo y, a

¹ Omento o mesenterio. Del griego μεσεντέριον. Repliegue del peritoneo, formado principalmente por tejido conjuntivo que contiene numerosos vasos sanguíneos y linfáticos y que une el estómago y el intestino con las paredes abdominales. En él se acumula a veces una enorme cantidad de células adiposas (Diccionario de la lengua española, 22ª ed., <http://www.rae.es>)

diferencia de GLP-1, GIP no inhibe el vaciado gástrico en humanos (Hansotia y Drucker, 2005).

2.1.1.1.6 Degradación de la hormona GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*)

Tanto GLP-1 como GIP son sometidos a una rápida escisión proteolítica por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-4, por sus siglas en inglés) en su penúltimo residuo de alanina, produciendo péptidos N-terminales incapaces de estimular la secreción de insulina. La vida media de GLP-1 bioactivo administrado exógenamente ha sido estudiada de menos de 2 minutos en roedores y en humanos normales y diabéticos. La vida media de GIP suministrada de forma intravenosa es de menos de 2 minutos en roedores y aproximadamente de 7 minutos en humanos normales. La ruta primaria para el desalojo de la incretina parece ser el riñón (Hansotia y Drucker, 2005).

2.1.1.2 Hormona GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*)

2.1.1.2.1 Síntesis y secreción de la hormona GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*)

GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*, por sus siglas en inglés) es producido y secretado por las células endócrinas “L” que predominan en la sección del intestino llamada íleon terminal y colon.

Se origina por procesamiento alternativo a partir de un precursor mayor, el preproglucagón, el cual es hidrolizado por las enzimas proconvertasas (PC1 y PC2), lo que origina distintos productos y fragmentos, según el tipo de tejido donde se lleve a cabo el proceso, y con actividad biológica diversa. Su forma bioactiva mayoritaria en plasma es el GLP-1(7-36)-amida (Álvarez *et al.*, 2009).

Tanto en individuos sanos como en aquellos con diabetes mellitus (DM) tipo 2, aumenta su secreción tras la ingesta de alimentos (fundamentalmente hidratos de carbono y ácidos grasos y en proporción con el contenido calórico) y provoca una inmediata respuesta en el páncreas (De la Higuera *et al.*, 2007).

2.1.1.2.2 Acción de GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*)

Hasta la fecha, ésta es la hormona insulínica más potente descrita en la literatura. La respuesta secretora de GLP-1 ante el ingreso energético es un proceso en el que intervienen mecanismos neurohumorales, puesto que las concentraciones de la incretina se elevan tras unos pocos minutos del episodio prandial mientras que el paso del alimento hacia el intestino es un proceso más prolongado (Hansotia y Drucker, 2005).

Además, es capaz de regular el apetito al inducir sensación de saciedad, esta reducción puede verse favorecida en parte por otras acciones que GLP-1 ejerce en el tracto gastrointestinal, donde inhibe la secreción de ácido gástrico inducida por la ingestión de alimentos, retrasa el vaciamiento gástrico y promueve la distensión gástrica, con lo que se crea una sensación de saciedad. La hormona GLP-1 controla entonces el balance energético (Álvarez *et al.*, 2009).

2.1.1.2.3 Receptor GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*)

GLP-1 ejerce sus funciones a través de un único receptor descrito hasta la fecha, el GLP-1R. El receptor de GLP-1, al igual que el receptor de GIP, pertenece a la súper familia de receptores acoplados a proteínas “G” ó GPCR (*G protein-coupled receptors* en inglés) (Álvarez *et al.*, 2009). Se encuentra positivamente acoplado a la activación de adenilato ciclasa, e incrementa el Ca²⁺ intracelular (Hansotia y Drucker, 2005).

2.1.1.2.4 Acción de GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*) en el páncreas

En el páncreas, el GLP-1 inhibe la secreción de glucagón y estimula la biosíntesis de insulina incrementando su transcripción. El GLP-1 estimula además la síntesis de insulina dependiente de glucosa (Hansotia y Drucker, 2005).

2.1.1.2.5 Efectos extra pancreáticos de la hormona GLP-1

Parece que existen receptores neuronales para el GLP-1 en el cerebro humano, realizando a ese nivel un efecto neurotrófico, regulando la plasticidad y la vida celular de las neuronas (De la Higuera *et al.*, 2007).

2.1.1.2.6 Degradación de la hormona GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*)

El péptido GLP-1 tiene una corta vida media en plasma (aproximadamente 2 min), donde es transformado por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-4) en péptidos inactivos (Álvarez *et al.*, 2009).

2.2 Mecanismo biológico del sabor en los mamíferos

La sensación del sabor comienza con la interacción entre las moléculas estimulantes del sabor y los receptores acoplados a proteínas G (GPCR, por sus siglas en inglés) en la membrana apical de las células receptoras del sabor (TRC, por sus siglas en inglés). Las células TRC (*Taste receptor cells*, en inglés) son células epiteliales especializadas con muchas propiedades neuronales incluyendo la habilidad de despolarizar y formar sinapsis. Las TRC en la boca se encuentran típicamente aglomeradas en grupos de aproximadamente 100 células. La superficie apical de las TRC, que hace contacto con la cavidad oral, es rica en microvellosidades enrevesadas que contienen los receptores GPCRs (*G protein-coupled receptors*, en inglés), canales iónicos, y otros elementos de transducción (Margolskee, 2002).

2.2.1 Receptores del gusto dulce en los mamíferos

Según Yarmolinsky *et al.*, (2009) validan al receptor T1R 2+3 (un receptor heteromérico compuesto de T1R2 y T1R3 subunidades) como el receptor mamífero del sabor dulce (Figura 2.1). Este receptor es capaz de reconocer azúcares simples en un amplio rango de edulcorantes artificiales, D-aminoácidos e incluso proteínas intensamente dulces. Sin embargo, el receptor del sabor dulce de los roedores no responde a varios edulcorantes que provocan respuestas en seres humanos. En la rata los receptores del sabor dulce responden a la glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, galactosa, dulcina, sacarina, acesulfame de potasio, sucralosa, D-triptófano y glicina, pero no con el aspartame, el ciclamato, monelina, neotamo ó taumatina (Li, 2002).

Las células receptoras gustativas de la lengua que expresan las subunidades T1R2 y T1R3 generalmente también expresan gustducina, una proteína G heterotrimérica. De hecho, la subunidad α de la gustducina ($G_{\alpha_{\text{gust}}}$) ha sido detectada en células de rata, ubicadas en el estómago, duodeno y conductos pancreáticos (Margolskee *et al.*, 2007). Y no sólo en roedores, también existe evidencia de que $G_{\alpha_{\text{gust}}}$, así como los receptores del gusto T1R2 y T1R3 se

expresen también en células humanas enteroendócrinas. Incluso Jang *et al.* (2007) observaron que aquellas células que secretaban GIP o GLP-1 eran las que también expresaban $G\alpha_{\text{gust}}$, mientras que los demás enterocitos se encontraban desprovistos de receptores del sabor (Jang *et al.*, 2007).

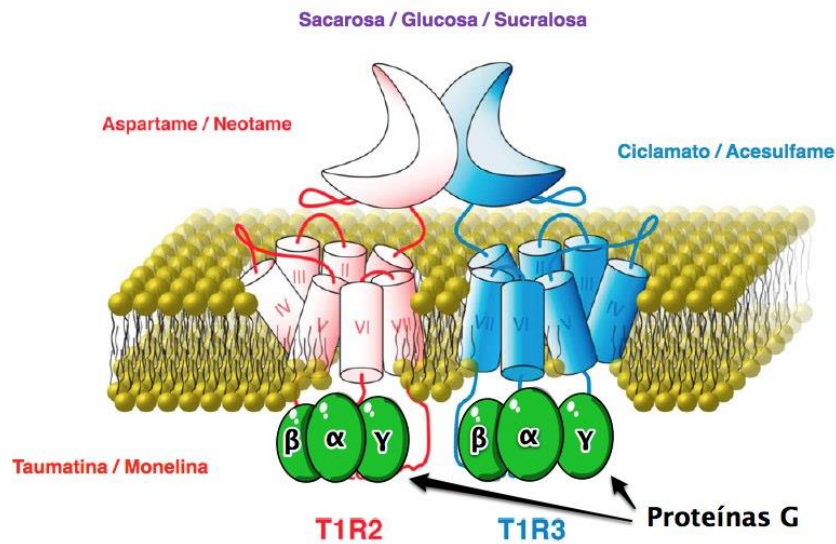


Figura 2.1. Receptor T1R 2+3 del gusto dulce acoplado a proteínas G (GPCRs, por sus siglas en inglés) y ejemplos de las moléculas que interactúan con cada subunidad (Fernstrom *et al.*, 2012)

De lo anterior se puede inferir que los receptores del sabor dulce se encuentran en regiones del tracto gastrointestinal, sobre todo, en las células L y K enteroendócrinas, aunque también se han identificado en células pancreáticas (Brown y Rother, 2012).

Por lo tanto, estas células quimiosensoriales en el intestino detectan aminoácidos, péptidos, azúcares y compuestos amargos y responden liberando péptidos localmente (por ejemplo, GLP-1) (Chaudhari y Roper, 2010).

De esta manera, uno de los papeles de los receptores del sabor dulce en las células enteroendócrinas puede ser la unión a los azúcares cuando se encuentran en el tubo digestivo,

facilitando el paso de la luz intestinal hacia la circulación y finalmente su llegada a las células del cuerpo que las necesitan para generar energía (Fernstrom *et al.*, 2012).

2.3 Mecanismo de regulación de la proteína transportadora de glucosa SGLT-1

SGLT-1 (*Sodium-glucose transporter protein*, en inglés) es un cotransportador activo de glucosa y galactosa de alta afinidad, que ha sido identificado en muchas especies de vertebrados con un alto grado de homología (80% o más). Este transportador es energizado por la ATPasa basolateral Na^+/K^+ y se ha calculado que tres moléculas de glucosa son transportadas por dos ATPs hidrolizados en el enterocito (Sejrsen, 2008).

Fernstrom *et al* (2012), sostienen que los péptidos GIP y GLP-1 estimulan la síntesis de proteínas transportadoras de glucosa como SGLT-1 en los enterocitos, facilitando así su absorción y finalmente su entrada a la circulación sanguínea (Fernstrom *et al.*, 2012).

De igual manera, Margolskee *et al.* (2007) proponen que la función de los sensores de azúcar luminal podría ser el controlar la expresión de la proteína transportadora de glucosa SGLT-1 en respuesta al azúcar proveniente de la dieta (Margolskee *et al.*, 2007). Y no son los únicos en apoyar esta hipótesis, Brown y Rother (2012) proponen un mecanismo que pueda explicar la posible regulación del transportador de glucosa en la Figura 2.2 A y B.

En el estado luminal de pocos hidratos de carbono (A), la glucosa se transporta en gran medida desde el lumen intestinal hacia dentro del enterocito a través de SGLT-1. La glucosa puede pasar de una manera bidireccional entre el enterocito y el torrente sanguíneo a través de GLUT2 (*Glucose transporter type 2*, en inglés) situado en la membrana basolateral, dependiendo de la concentración de glucosa en plasma y de las necesidades metabólicas de los enterocitos.

En presencia de una concentración alta de hidratos de carbono lumbales, (B) la glucosa se une a los receptores de sabor dulce iniciando una cascada de transducción de señales que resulta en la liberación de GLP-1, el cual puede actuar de una manera parácrina en los enterocitos cercanos para regular al alza el transportador GLUT2 apical. Los edulcorantes no nutritivos

pueden unirse también a receptores entero endócrinos del gusto dulce, causando la secreción de GLP-1 (*in vitro*) y aumentando la captación intestinal de glucosa (en roedores) (Brown y Rother, 2012).

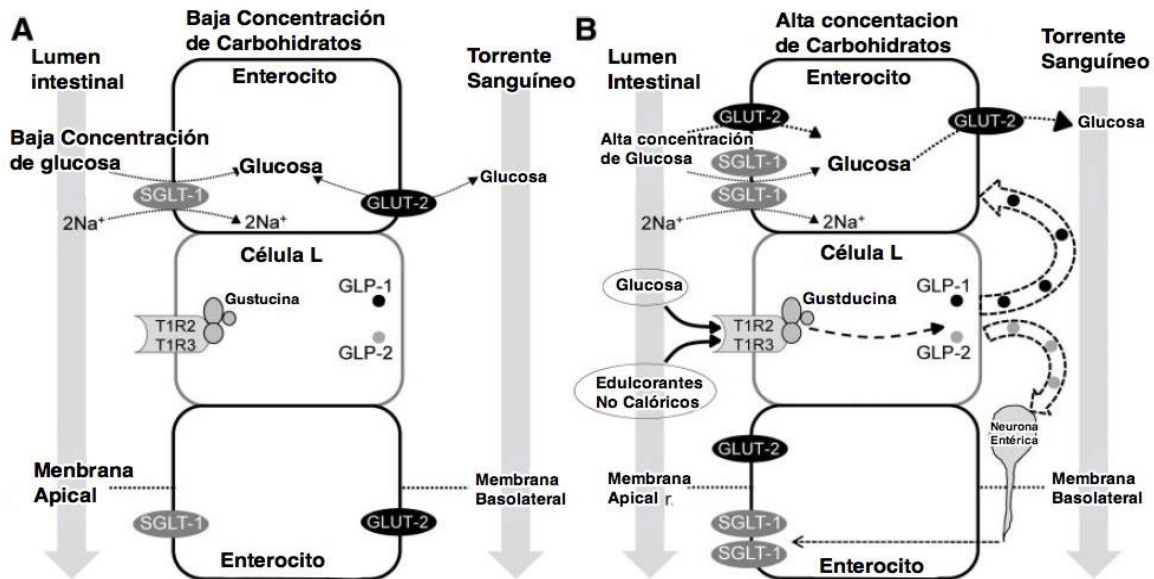


Figura 2.2. Modelo de la absorción intestinal de glucosa en un enterocito y su interacción con una célula L-enteroendócrina. (A) En un estado de ayuno o un estado luminal de pocos hidratos de carbono. (B) Después de una comida rica en hidratos de carbono, con o sin edulcorantes no energéticos (Brown y Rother, 2012).

Estos datos apoyan la idea de que la unión del ligando a los receptores del sabor dulce en las células L es parcialmente responsable de la secreción de hormonas; sin duda también hay mecanismos independientes del receptor del gusto dulce (Brown y Rother, 2012).

Dado el contexto anterior, en este estudio se pretendió comprender la relación que existe entre el sabor dulce que percibimos de los alimentos y la secreción de las hormonas relevantes para la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, así como sus repercusiones en los hábitos alimenticios y sobre la salud. Para ello se realizó el experimento basado en la metodología que se describe en el apartado siguiente.

2.4 Edulcorantes

2.4.1 Edulcorantes naturales

2.4.1.1 Sacarosa

También llamada “azúcar común”, es un disacárido formado por los monosacáridos fructosa y glucosa, unidos mediante un enlace glucosídico. Dicho enlace impide que este disacárido posea poder reductor, debido a que en su estructura carece de grupos aldehído o cetonas a diferencia de los monosacáridos que la componen. La sacarosa es extraída de la caña de azúcar o de la remolacha y generalmente es purificada y cristalizada. En la literatura no se encuentran datos de toxicidad de la sacarosa pero sí de la glucosa y de la fructosa individualmente. Niveles altos de glucosa en la sangre pueden producir daño en los ojos, al sistema nervioso, riñones y corazón a largo plazo (Varzakas *et al.*, 2012).

2.4.1.2 Fructosa

Al principio pareció ser un compuesto amigable nutricionalmente hablando, por su realmente bajo índice glicémico de tan sólo 23 (Casanueva, 2008). Sin embargo, la fructosa, al menos en grandes cantidades, puede causar serios inconvenientes. La fructosa es metabolizada casi exclusivamente en el hígado y es muy probable que se transforme en lípidos, lo cual aumenta el riesgo de enfermedades cardíacas. Además, trabajos recientes muestran que este edulcorante puede tener influencia sobre las hormonas que controlan el apetito. Es decir, altos niveles de fructosa podrían provocar sensaciones de falta de saciedad y podrían llevar a comer en exceso (Varzakas *et al.*, 2012).

2.4.1.3 Stevia

De las hojas de la planta *Stevia rebaudiana* (nativa de Sudamérica) es extraído el “esteviósido”, nombre que se le da a un grupo de glucósidos diterpenos dulces propios de la stevia. Los esteviósidos muestran buena estabilidad en forma sólida. Son además relativamente estables en bebidas ácidas a 22°C. Su consumo ha sido aprobado en algunos países sudamericanos y asiáticos, pero falta su aprobación en Europa y América del Norte. La planta *Stevia rebaudiana Bertoni*, es un arbusto perenne perteneciente a la familia de las Asteráceas, nativa de ciertas regiones de Sudamérica (Paraguay y Brasil) (O’Brien-Nabors, 2012).

Es frecuentemente llamada “la hierba dulce de Paraguay” constituida principalmente por un esteviol triglicosilado (esteviósido) constituyendo del 5 a 10% en hojas secas. Otro constituyente principal con 2 a 4% de composición es un rebaudiósido A (esteviol tetraglicosilado), rebaudiósido C (1 a 2%) y dulcósido A (0.5 a 1%). La planta presume efectos medicinales incluyendo actividad antidiabética. Estudios sobre toxicidad aguda revelan muy baja toxicidad en stevia y por el esteviósido. Ambos son seguros cuando son usados como edulcorantes. Están hechos para personas diabéticas, así como para personas obesas que deseen perder masa corporal mediante la eliminación de glúcidos en la dieta. Parece no provocar ninguna reacción alérgica. El esteviósido es cerca de 300 veces más dulce que el azúcar (solución al 0.4%). Las ventajas de usar el esteviósido como un suplemento en la dieta para humanos son: 1) es estable, 2) es considerado hipocalórico, 3) mantiene una buena salud bucal por reducir la ingesta de azúcar y 4) abre la posibilidad de su uso para pacientes diabéticos o personas obesas. En diciembre de 2008, la FDA dio su aprobación de tipo “no objeción” para el estatus de “generalmente reconocido como seguro” (*GRAS*, por sus siglas en inglés) al edulcorante comercial *Truvia* (desarrollado por *Cargill* y la Compañía *Coca-Cola*) y a *PureVia* (desarrollada por *PepsiCo* y la *Whole Earth Sweetener Company*), ambos productos son totalmente extraídos de la planta de *Stevia*. Un resabio amargo asociado a *Stevia* ha sido un impedimento para compañías que desean utilizarla como edulcorante, y compañías productoras de extractos de sabores han intentado encontrar maneras de enmascararlo sin desvirtuarla de los beneficios propios de su estatus natural. Como resultado de las investigaciones para detectar el compuesto responsable del resabio amargo, se tiene la hipótesis de que algunos compuestos alcaloides de tipo *iminosugar*² sean los responsables del mismo. Pero tanto, su síntesis como la actividad biológica de estos compuestos aún se encuentran bajo estudio (Varzakas *et al.*, 2012).

2.4.2 Edulcorantes artificiales

2.4.2.1 Aspartame

Su nombre químico es L-alfa-aspartil-L-fenilalanina metil éster, se trata de un polvo blanco, cristalino, sin olor, que se deriva de los aminoácidos: ácido aspártico y fenilalanina. El aspartame es aproximadamente 200 veces más dulce que el azúcar. Cuando es consumido, el

² *Iminosugar*. Cualquier análogo de un glúcido que contenga un átomo de nitrógeno en la posición del átomo de oxígeno endocíclico (<http://www.web-definition.com/dictionary/i/im/iminosugar/>).

aspartame se metaboliza en sus aminoácidos originales y proporciona un bajo contenido energético. El aspartame es estable cuando se encuentra seco o congelado, pero se descompone y pierde su poder edulcorante con el transcurso del tiempo, cuando se conserva en líquidos a temperaturas superiores a 30°C. El inconveniente de su uso es que podría reaccionar con otros sabores de la comida, pero puede utilizarse para endulzar postres congelados, gelatinas, bebidas y en gomas de mascar. Es probablemente el más controversial de los edulcorantes artificiales de alta intensidad en el mercado. Existen estudios que afirman que este edulcorante puede causar efectos en la salud en sus consumidores, como esclerosis múltiple, lupus sistémica, tumores cerebrales y toxicidad por metanol, y recientes reportes sugieren que el aspartame puede estar relacionado con cáncer, linfomas y leucemia; estos reportes se encuentran basados en investigaciones utilizando ratas. En 2006 y 2007, estos hallazgos fueron publicados en la Fundación Europea Ramazzini (*ERF*, por sus siglas en inglés) y en Ciencias Oncológicas y Ambientales (Varzakas *et al.*, 2012).

Estas denuncias relativas al aspartame y sus efectos en humanos, fueron cuidadosamente evaluadas por científicos de las agencias regulatorias de la Unión Europea y los Estados Unidos. La conclusión fue que el aspartame no causa ninguno de los efectos mencionados. La única desventaja de este edulcorante es que no puede ser consumido por individuos que sufren de fenilcetonuria. El aspartame se encuentra aprobado en más de 90 países (la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Sudamérica, Australia, Japón, etc.) para su uso en numerosos productos alimenticios. La FDA ha impuesto el IDA en 50mg/kg de masa corporal/día para aspartame. La FAO recomienda que una ingesta de 40mg/kg de masa corporal/día preferentemente no debe ser excedida por niños y diabéticos. El reporte de la Comisión Europea (*EC*, por sus siglas en inglés) da un máximo teórico estimado para adultos de: 21.3mg/kg de masa corporal/día (Varzakas *et al.*, 2012).

2.4.2.2 Acesulfame

Es aproximadamente 200 veces más dulce que el azúcar. No se metaboliza en el organismo humano, excretándose rápidamente aparentemente sin cambios químicos, por lo que no tiende a acumularse. Es perfecto para bebidas bajas en calorías ya que posee una estabilidad en soluciones acuosas pronunciada y es además adecuado para refrescos de dieta que mantienen un pH bajo (O'Brien-Nabors, 2012).

Según sus fabricantes, el acesulfame tiene una excelente estabilidad a altas temperaturas y posee buena solubilidad lo que lo hace adecuado para numerosos productos. Su uso está aprobado en alimentos y bebidas en cerca de 90 países incluyendo los Estados Unidos, Suiza, Noruega, Reino Unido, Canada, Australia y en la Unión Europea. En Europa la ingesta diaria admisible (IDA) fue establecida en 9mg/kg de masa corporal/día, el cual es el límite también establecido por la JECFA y la FDA (Varzakas *et al.*, 2012).

2.4.2.3 Mezcla de acesulfame con aspartame

Estos dos edulcorantes se convierten en un edulcorante más potente que si son usados independientemente. Es decir, aspartame y acesulfame muestran sinergismo cuantitativo, en cuanto al sabor dulce se refiere. Su sabor se encuentra algunas veces acompañado de un resabio amargo y metálico. Su mezcla no presenta problemas de estabilidad en condiciones normales de almacenamiento y se disuelve completamente en la saliva y en el jugo gástrico. Aunque esta sal principalmente consiste en los dos edulcorantes aprobados para su consumo, puede ser considerado como un compuesto aparte, el cual requiere de aprobación específica en ciertos países. Su uso está aprobado en los Estados Unidos, Canadá, Reino Unido, México, Rusia y China (Varzakas *et al.*, 2012).

2.4.2.4 Sucralosa

Edulcorante fabricado por halogenación selectiva de sacarosa, proceso químico que reemplaza los tres grupos hidroxilo de la molécula de sacarosa por cloro, obteniendo como resultado un edulcorante que es aproximadamente 600 veces más dulce que la sacarosa, pero que aporta pocas calorías. Es termoestable y resiste las variaciones de pH, puede usarse en pastelería o en productos de larga vida de anaquel (O'Brien-Nabors, 2012).

Según los fabricantes, la mayor parte de la sucralosa ingerida no es absorbida por el tracto gastrointestinal, sino que es directamente secretada, pero entre el 11 y el 27% de ella sí es absorbida. La mayor parte de la sucralosa absorbida es removida del torrente sanguíneo por el riñón y eliminada en la orina, mientras que un 20 a 30% es metabolizada. La FDA ha concluido que la sucralosa no posee ningún riesgo carcinogénico, reproductivo o neurológico. La JECFA la evaluó favorablemente y en 1990 recomendó un IDA de 0 a 15mg por kilogramo de masa corporal. El uso de sucralosa está aprobado en una amplia gama de productos en Canadá,

Estados Unidos, Australia, México, Rusia, Rumania, China y la Unión Europea. Ha sido usada como edulcorante en bebidas carbonatadas y bebidas alcohólicas, postres congelados, confitería, productos para panadería, frutas enlatadas y vegetales, goma de mascar, mezcla de productos deshidratados, productos de consumo diario, condimentos, postres y cereales para el desayuno (Varzakas *et al.*, 2012).

2.4.2.5 Sacarina

Al día de hoy, la sacarina es ampliamente utilizada, aunque existe una gran controversia sobre su seguridad. Numerosos estudios toxicológicos han sido llevados a cabo en una amplia variedad de especies animales. La sacarina es excretada sin absorción, con excepción de un pequeño porcentaje que es acumulado en la vejiga. Ha sido demostrado que el compuesto no es genotóxico, y que no se une al ADN. La mayor preocupación acerca de sus efectos metabólicos se debe a la incertidumbre sobre su carcinogenicidad en humanos. Sin embargo, un número considerable de extensos estudios epidemiológicos en humanos no han mostrado una relación entre el consumo de sacarina y cáncer de vejiga. En Estados Unidos, la FDA quitó de la lista de alimentos seguros para su consumo a la sacarina en 1972 debido a la incertidumbre en cuanto a su seguridad, y su uso en comida y bebidas fue prohibido en 1977. Sin embargo, la protesta pública llevó a la imposición de una moratoria en la prohibición, la cual se ha extendido hasta ahora. En Canadá, la sacarina fue prohibida en 1977 para su uso en alimentos. Sin embargo, su venta está permitida en farmacias como edulcorante de mesa. Directivos de la Unión Europea 94/35/EC (Comisión Europea 1994), 96/83/EC (1996), 2003/115/EC (2003), y 2006/52/EC (2006) definen en qué alimentos y en qué cantidad la sacarina puede ser usada (Varzakas *et al.*, 2012).

2.5 Investigaciones sobre estos edulcorantes

La absorción intestinal de glucosa consta de dos mecanismos: uno es la clásica vía mediante el difusión a través del canal Na⁺-glucosa (*SGLT1*, por sus siglas en inglés), y la otra es por transporte activo apical con ayuda del transportador GLUT2. Investigaciones de Mace *et al.* (2007) demuestran que los edulcorantes artificiales incrementan la absorción de glucosa en el orden: acesulfame de potasio ~ sucralosa > sacarina, en paralelo con su habilidad de incrementar la concentración de calcio intracelular. Para comprobar lo anterior, llevaron a cabo

una investigación en ratas, en el cual perfundieron directo al yeyuno soluciones de glucosa (20mM) durante 30min como velocidad control, y lo compararon con la perfusión de una solución de glucosa (20mM) que contenía además sucralosa (1mM), observaron que en aquella perfusión donde se agregó sucralosa, la tasa de absorción se duplicó. Este efecto, lo atribuyen a la introducción de 3.4 veces más canales trasportadores de glucosa GLUT2.

En paralelo, estudios llevados a cabo por Margolskee *et al.*, (2007) mencionan que la gustducina y el receptor T1R3 forman parte de la maquinaria dentro de la mucosa del intestino delgado que regula la expresión de la proteína SGLT1 en respuesta a azúcares de la dieta. Demostraron lo anterior experimentando con ratones durante 2 semanas, suministrándole a un grupo una dieta rica en hidratos de carbono (70% de sacarosa) y a otro grupo una dieta pobre en hidratos de carbono (1.9% de sacarosa), encontraron que la cantidad de ARNm (ARN mensajero) para formar la proteína SGLT1 (proteína transportadora de glucosa) intestinal, en el caso de la dieta rica en carbohidratos fue de 1.6 veces mayor ($P = 0,003$) que la encontrada en los ratones alimentados con una dieta pobre en hidratos de carbono. Además, mantuvieron ratones de tipo silvestre y ratones modificados (gen anulado para gustducina y receptor del gusto dulce T1R3) durante 2 semanas, en dos grupos, el primer grupo con una dieta baja en carbohidratos y al otro grupo le agregaron sucralosa al agua (2mM *ad libitum*). Para los ratones de tipo silvestre que tomaron sucralosa, hubo un aumento de 2.1 veces en la expresión de ARNm para SGLT1 y un incremento de 2.2 veces en la proteína SGLT1 comparado con el control de los ratones modificados. La magnitud de estos cambios fue similar a los cambios producidos en la dieta rica en hidratos de carbono la cual contenía los edulcorantes naturales. En cuanto a aquellos ratones modificados que se les suministró sucralosa, no presentaron incrementos en la expresión de ARNm para SGLT1 o la proteína SGLT1.

Ambas investigaciones revelan que los edulcorantes artificiales son nutricionalmente activos, porque provocan un aumento en los canales de transporte de glucosa y, por lo tanto, un aumento en su absorción, todo esto mediante señales que envían al sistema de receptores del sabor que se encuentran en el intestino. Este hecho tiene implicaciones importantes para la nutrición y el tratamiento de la obesidad y la diabetes (Mace *et al.* 2007).

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA PROPUESTA DURANTE EL DESARROLLO EXPERIMENTAL

En el Diagrama 3.1 se resume toda la metodología que se realizó durante el experimento biológico empleando ratas macho Wistar de 125 a 150g.

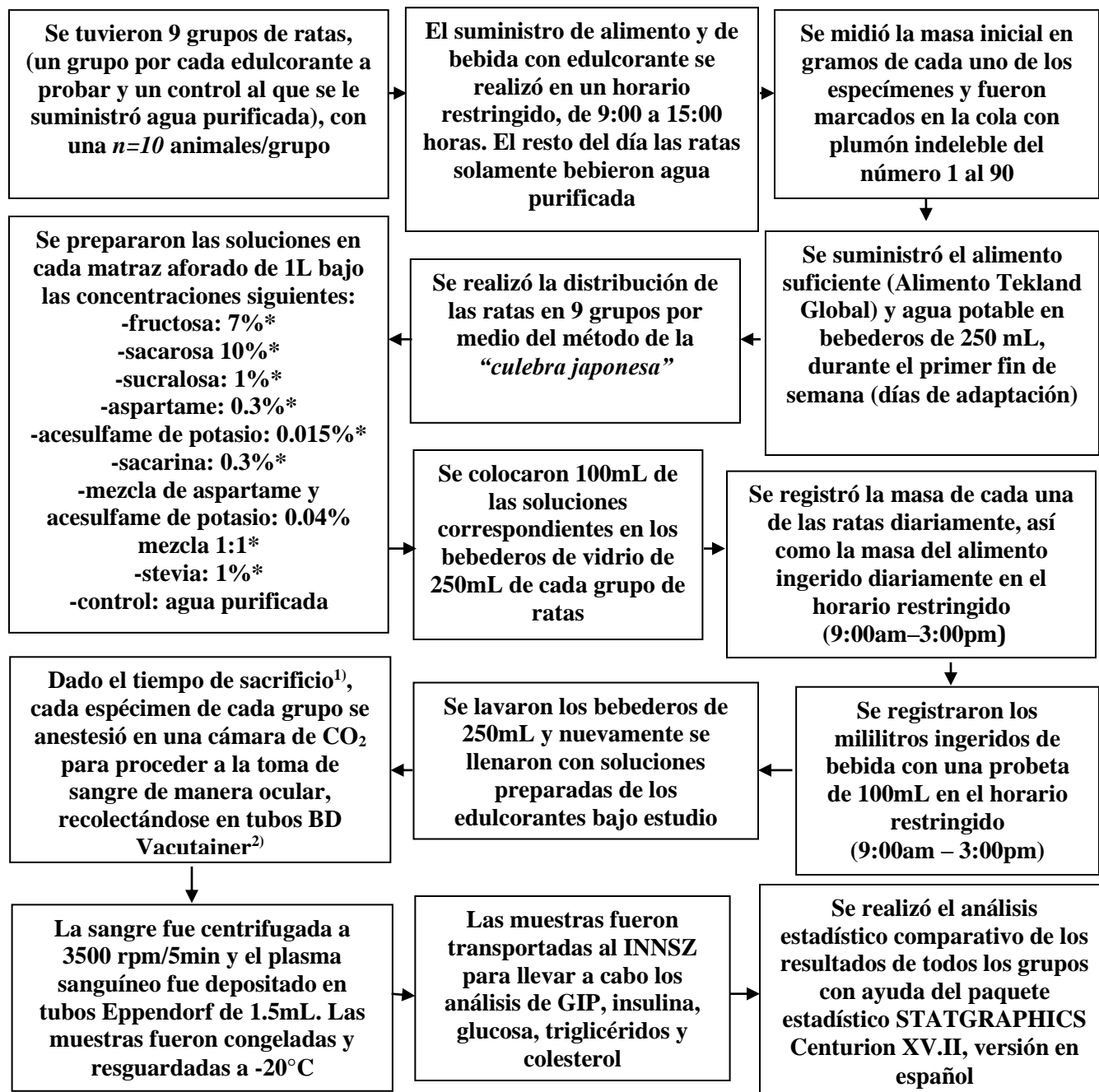


Diagrama 3.1. Metodología para el desarrollo experimental

*Los valores de los edulcorantes están dentro de la ingesta diaria aceptada, *ADI*, *acceptable daily ingesta*, en inglés (JECFA, 1993) y encontradas normalmente en una bebida que emplea edulcorantes artificiales. Los valores para azúcar y fructosa se tomaron de acuerdo con lo propuesto por Jürgens *et al.*

1) Ver la descripción de la metodología detalladamente

2) Por recomendaciones de especialistas del Laboratorio de Fisiología de la Nutrición del IMNSZ (Torres y Tovar, 2013)

3.1 Descripción detallada de la metodología

3.1.1 Solicitud de los especímenes para la experimentación

Para llevar a cabo el experimento, se solicitaron al proveedor *Harlan*, 90 ratas macho Wistar entre los 125 a 150g. Con el objetivo de formar grupos de 10 ratas cada uno, y así evaluar 8 edulcorantes, el grupo restante o control únicamente bebió agua purificada. Se solicitó además que las ratas fueran entregadas en 3 grupos de 30 individuos los días viernes, para que así tuvieran viernes, sábado y domingo como periodo de acondicionamiento. Los edulcorantes utilizados se acomodaron de la siguiente manera por cada recepción:

- **“Primera recepción”** Edulcorantes evaluados: sacarosa (10%), fructosa (7%), sucralosa (1%).
- **“Segunda recepción”** Edulcorantes evaluados: aspartame (0.3%), acesulfame (0.015%), mezcla de aspartame y acesulfame (0.04% 1:1).
- **“Tercera recepción”** Edulcorantes evaluados: sacarina (0.3%), stevia (1%) y el control (agua purificada).

3.1.2 Preparación de las jaulas

En la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), de la Facultad de Química de la UNAM, en su Conjunto E, dentro de un cuarto con humedad y temperatura controlada, programado para emitir 12 horas luz y 12 horas de obscuridad, se acondicionó un anaquel o *Rack* para recibir a los especímenes de experimentación: 90 ratas Wistar macho entre los 125 a 150g. Para lo anterior primero se lavó el anaquel metálico y, una vez limpio, se colocó en la parte inferior de cada una de las jaulas individuales una cama de aserrín. Se reunieron los comederos de metal suficientes, es decir, uno para cada jaula individual. De igual manera se recolectaron y acondicionaron las botellas de vidrio y los tapones de hule con bebedero que se utilizarían para dar las bebidas a las ratas.

3.1.3 Llegada y acondicionamiento de los especímenes a la UNEXA

En la “primera recepción”, el proveedor *Harlan* hizo llegar las primeras 30 ratas con las especificaciones antes mencionadas a la UNEXA del Conjunto E para un periodo de adaptación de 3 días (viernes a domingo), para esto las ratas permanecieron en cajas de plástico (5 ratas por caja) con alimento y agua purificada sin restricciones como se observa en la Imagen 3.1.

Esto con se realizó con la finalidad de que se adaptaran al cambio de ambiente (agua, alimento, humedad, horas luz y temperatura). Las ratas que fueron entregadas hasta la “segunda y tercera recepción” se sujetaron el mismo periodo de adaptación de 3 días con alimento y agua purificada sin restricciones. Los porcentajes nutrimentales del alimento comercial “Teklad Global para roedores” el cual se les administró durante todo el experimento a los especímenes se enlistan a continuación:

- Proteína cruda 18%
- Grasa cruda 5%
- Fibra cruda 5%

3.1.4 Distribución de los especímenes mediante el método de la culebra japonesa

El mismo día de la llegada de los especímenes a la UNEXA, fueron marcados cada uno con números del 1 al 30 con un plumón indeleble en la cola para su identificación. Se utilizó el método conocido como ‘culebra japonesa’ (método que distribuye de forma homogénea a las ratas con masas distintas) para formar 3 grupos de 10 ratas cada uno, en la Imagen 3.2 se ilustra uno de los grupos de 10 ratas. Los grupos de 30 ratas que llegaron las semanas posteriores, (2^{da} y 3^{ra}) fueron marcados con números del 31 al 60 y del 61 al 90 respectivamente, para después ser también distribuidos en grupos de 10 ratas cada uno.



Imagen 3.1. Ratas tomando agua *ad libitum*



Imagen 3.2. Grupo de 10 ratas distribuidas por el método de la “culebra japonesa”

3.1.5 Bebida y alimento proporcionado

Después de haber formado los grupos de 10 ratas, se les asignó a cada uno el edulcorante que les sería suministrado. Por lo que a las 30 ratas entregadas en la primera recepción, se les asignaron los edulcorantes siguientes: fructosa, sacarosa y sucralosa, en total fueron diez ratas para evaluar cada uno de ellos, por lo que para llevar a cabo lo anterior, se prosiguió con la siguiente cronología:

- 1) El día domingo, se colocó al primer grupo de 10 ratas en jaulas individuales de anaqueles metálicos rodantes (“*rack*” en inglés), el cual permite separar a las ratas individualmente y fue en el que se llevó a cabo el experimento; este día aún se les proporcionó agua y alimento “*ad libitum*”, como se muestra en las Imágenes 3.3.



Imágenes 3.3 Rack de jaulas individuales con los bebederos y su identificación independiente

- 2) El día lunes, a este grupo que ya se localizaba en el *rack*, se le cambió el agua por una solución de fructosa al 7%, en un horario de 9:00am a 3:00pm, convirtiéndose en el grupo con el que se evaluó a este edulcorante. (El resto del día tomaron agua natural). Este mismo día, correspondiente al “día 1” de experimentación, el grupo de fructosa experimentó un cambio de horario en su alimentación, pues se les restringió en un horario fijo: de 9:00am a 3:00pm. Esas fueron las condiciones de experimentación que continuaron durante los 7 días posteriores, hasta el siguiente domingo.
- 3) Ese mismo lunes se introdujeron otras 10 ratas al mismo *rack*, en jaula individual, para que pasaran también 24 horas adaptándose al mismo, con agua purificada y comida “*ad libitum*”.
- 4) Para el día martes, a las ratas del segundo grupo se les cambió el agua purificada por una solución de sacarosa al 10%, con un horario de 9:00am a 3:00pm, convirtiéndose en el

grupo para evaluar sacarosa e igualmente se les restringió el alimento en el mismo horario. Siendo éste entonces, el “día 1” de experimentación.

- 5) Ese mismo día martes, se introdujeron las últimas 10 ratas al rack con alimento y agua purificada “*ad libitum*”, como se muestra en la Figura 3.4.
- 6) Siguiendo la secuencia, el día miércoles, o “día 1” de experimentación para el último grupo de 10 ratas, se les cambió la bebida por una solución de sucralosa al 1% también únicamente de 9:00 a 3:00pm, restringiendo su alimentación en el mismo horario. A partir de este momento, todos los grupos continuaron en un horario restringido de alimentación y tomando la solución de edulcorante que les correspondía dentro del mismo horario durante los 7 días de experimentación.
- 7) En todos los días de experimentación se pesaron los gramos de alimento que ingirió cada rata y se midieron los mililitros de la bebida con el edulcorante que tomaron. También fueron pesadas las ratas diariamente a la misma hora para evitar variaciones por el factor tiempo, que fue a las 8:30am en punto.



Imagen 3.4. Rata en jaula individual con alimento a un costado

3.1.6 Condiciones para llevar a cabo la toma de muestra sanguínea

El día lunes de la siguiente semana, el cual correspondió al día 8 de la experimentación, a las 10 ratas del grupo de fructosa se les tomó una muestra de sangre de aproximadamente 3 mL por vía ocular bajo las siguientes condiciones:

CONDICIÓN AYUNO: Se tomó una muestra de sangre a **1** rata en ayuno, a las 9:00am en punto. De esa forma se presumió que la rata tuviera alrededor de unas 18 horas de ayuno.

CONDICIÓN EDULCORANTE: A **3** ratas del mismo grupo se les suministró con una cánula 1mL de una solución al 18%³ de fructosa (4.5g en 25mL), la administración de esta solución, se llevó a cabo a las 9:02am para la primera rata, a las 9:04am para la segunda rata y a las 9:06am para la tercera rata; para tomar la muestra sanguínea de cada una de ellas a las 9:32, 9:34 y 9:36am, respectivamente. De esta manera cada rata tuvo 30 minutos de espera después de la ingesta del edulcorante.

CONDICIÓN EDULCORANTE CON COMIDA: A otras **3** ratas del mismo grupo se les suministró 1mL de solución a la misma concentración de edulcorante (18%²) con una cánula, pero después se les proporcionó alimento previamente pesado, y se les dieron 30 minutos exactos para comer el alimento antes de la toma de sangre, esto fue con el objetivo de que se encontraran en la etapa postprandial. Esto inició a las 9:08, 9:10 y 9:12 por lo que la toma de muestra se realizó a las 9:38, 9:40 y 9:42 respectivamente.

CONDICIÓN COMIDA: A las últimas **3** ratas del grupo de fructosa se les suministró 1 mL de agua purificada mediante una cánula (para evitar variaciones) y después se les dejó comer también el alimento previamente pesado por exactamente 30 minutos. Esto fue a las 9:14, 9:16 y 9:18 am, por lo que la muestra de sangre fue tomada a las 9:44, 9:46 y 9:48 am, respectivamente.

Estas condiciones se aplicaron para cada uno de los grupos de ratas llevándose a cabo el día “8” de experimentación correspondiente, y las condiciones que se aplicaron se resumen a continuación en la Tabla 3.1.

El apego a los tiempos de toma de muestra sanguínea establecidos fue la prioridad en el desarrollo del experimento y es por esta razón que los días de experimentación de cada grupo de edulcorantes se encontraron desfasados, debido a la restricción de tiempo que se tuvo que

³ Por recomendaciones de especialistas del Laboratorio de Fisiología de la Nutrición del INCMYNSZ

tomar para cada una de las muestras sanguíneas; pero con esto se pretendió encontrar resultados significativos para los análisis de hormonas GIP e insulina que se realizaron posteriormente.

Tabla 3.1. Condiciones y tiempos utilizados el día de toma de muestra (día 8)

Condición	Tiempo de suministro	Tiempo de toma de muestra	Número de ratas
AYUNO	NA	9:00am, t=0min	n=1
EDULCORANTE 1mL (0.18%)	9:02am, t=0min 9:04am, t=0min 9:06am, t=0min	9:32am, t=30min 9:34am, t=30min 9:36am, t=30min	n=3
EDULCORANTE 1mL (0.18%) + COMIDA	9:08am, t=0min 9:10am, t=0min 9:12am, t=0min	9:38am, t=30min 9:40am, t=30min 9:42am, t=30min	n=3
COMIDA ("ad libitum")	9:14am, t=0min 9:16am, t=0min 9:18am, t=0min	9:44am, t=30min 9:46am, t=30min 9:48am, t=30min	n=3

Nota: NA=No aplica

3.1.7 Anestesia empleando la cámara de CO₂

Un minuto antes de llevar a cabo la toma de muestra ocular a las ratas, éstas fueron introducidas en una pequeña cámara de vidrio con CO₂, para disminuir su grado de conciencia y así facilitar la toma de la muestra de sangre y evitar sufrimiento innecesario a los especímenes, en el marco del trato humanitario a los animales de prueba, la cámara de CO₂ se aprecia en la Imagen 3.5.



Imagen 3.5. Cámara de CO₂ en donde se realizó la anestesia

3.1.8 Toma de muestra sanguínea vía ocular

Justo después de sacar a cada rata de la cámara de CO₂, se utilizó un capilar de vidrio nuevo para introducirlo en el lagrimal de la rata adormecida y así obtener la muestra de sangre. La sangre fue colectada en tubos tipo *BD Vacutainer* de 5mL (los cuales facilitan la separación entre los eritrocitos y el plasma), como se observa en la Imagen 3.6. Minutos después la muestra fue centrifugada a 3500rpm durante 5 minutos, causando la separación del plasma (como se puede apreciar en la Imagen 3.7), para después ser colectado en tubos marca Eppendorf de 1.5mL, los cuales fueron almacenados a -20°C para llevar a cabo análisis posteriores. Al finalizar, los tubos tipo *BD Vacutainer* fueron desechados en recipientes adecuados para tal finalidad.

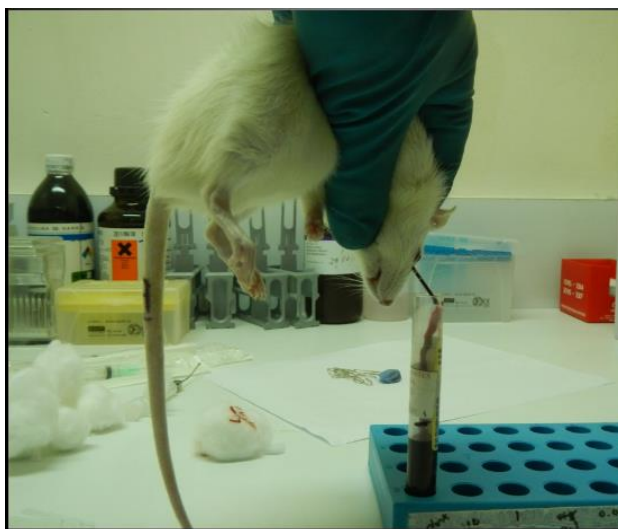


Imagen 3.6. Toma de muestra de sangre vía ocular en tubos *Vacutainer*



Imagen 3.7. Separación del plasma en tubos *Vacutainer* posterior a la centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos

3.1.9 Traslado de muestras y análisis bioquímico

Las muestras de sangre resguardadas a -20°C se transportaron posteriormente al laboratorio de Fisiología de la Nutrición del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMyNSZ) para llevar cabo los análisis correspondientes:

1) Para la determinación de la hormona GIP, se adquirió el Kit MILLIPLEX® MAP que se ordenó exclusivo para esta hormona, se utilizó además para la lectura del Kit el equipo MAGPIX® con software xPONENT disponible en el INCMyNSZ. El principio de la técnica y la metodología completa se presentan en el Anexo 1.

2) El método utilizado para medir la cantidad de insulina fue un radioinmunoanálisis (RIA), ayudados de un Kit de MILLIPLEX® para rata adquirido también para tal finalidad, el cual se empleó en las instalaciones del INCMyNSZ habilitadas para manipular compuestos radioactivos. El procedimiento completo se adjunta en el Anexo 2.

3) En el caso de la determinación de glucosa, se utilizó un electrodo o sensor enzimático (YSI 2700), el cual contiene enzimas oxidasas inmovilizadas que desencadenan reacciones utilizando a la glucosa como reactivo. El electrodo es entonces capaz de determinar la concentración de glucosa en la muestra. El principio de esta técnica se presenta en el Anexo 3. Cabe mencionar que todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

4) Para medir los triglicéridos y el colesterol se adquirieron los Kits: Triglicéridos FS* y Colesterol FS*, para lo cual se determinaron por duplicado con la ayuda del espectrofotómetro *Varian Cary 3E*, ambos parámetros se leyeron a 500nm. Los reactivos, reacciones y cálculos involucrados son incluidos en el Anexo 4.

3.1.10 Análisis estadístico

De todos los datos obtenidos, se realizaron análisis estadísticos para buscar diferencias significativas. Para ello, se utilizó como herramienta el paquete estadístico *STATGRAPHICS Centurion XV.II*, versión en español.

A continuación, en el capítulo 4 se presentan los resultados obtenidos de esta investigación realizándose una discusión de los mismos.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación se presentarán los datos correspondientes al ensayo biológico que involucró a las 90 ratas Wistar, las cuales ingirieron su correspondiente edulcorante en un horario restringido (9:00am a 3:00pm), con el mismo horario para el suministro de alimento.

Cabe mencionar que las ratas macho Wistar fueron divididas en grupos de 10 individuos, brindándole a cada grupo de 10 ratas los siguientes edulcorantes: sacarosa (10%), fructosa (7%), sucralosa (1%), aspartame (0.3%), acesulfame de potasio (0.015%), mezcla de aspartame y acesulfame de potasio (0.04% 1:1), sacarina (0.3%), stevia (1%) y un grupo de control que ingirió únicamente agua potable durante todo el experimento. Los porcentajes fueron sugeridos por formar soluciones de igual poder edulcorante a dos cucharaditas copeteadas de azúcar en un vaso de agua según los fabricantes, o semejando las bebidas comerciales (Pérez y Reyes, 2010).

4.1 Determinación del alimento ingerido

En la Tabla 4.1 y en el Gráfico 4.1 se reporta el promedio del alimento ingerido por cada grupo de edulcorantes por cada día de experimentación. En ellos se observan que en el día uno, en promedio, las ratas de todos los grupos de edulcorantes ingirieron muy poca cantidad de alimento, esto se explica por la restricción de horario de comida que se impuso, la cual, como se esperaba, al principio resultó algo novedoso para los roedores, pero con el paso de los días se fueron condicionando a esta respuesta y aprendieron a comer en el horario establecido, elevando cada vez más la ingesta de alimento promedio por parte de las ratas de todos los grupos.

TABLA 4.1. PROMEDIO DE ALIMENTO INGERIDO EN GRAMOS POR CADA GRUPO DE EDULCORANTE POR DÍA

GRUPOS DE EDULCORANTES									
DÍAS	FRUCTOSA	SACAROSA	SUCRALOSA	ASPARTAME	SACARINA	ACESULFAME	MEZCLA	STEVIA	CONTROL
1	5.3 ± 1.2	3.6 ± 1.8	4.0 ± 2.2	3.1 ± 0.9	6.5 ± 2.2	4.1 ± 1.9	5.2 ± 1.2	5.2 ± 1.4	3.3 ± 1.2
2	6.2 ± 1.3	9.6 ± 1.5	8.3 ± 2.3	9.0 ± 0.7	10.0 ± 1.5	9.7 ± 2.4	9.8 ± 2.6	9.7 ± 1.4	10.5 ± 2.3
3	11.7 ± 2.7	10.1 ± 2.1	10.9 ± 0.8	12.8 ± 2.0	11.9 ± 1.9	11.6 ± 2.5	7.2 ± 1.4	14.4 ± 1.7	13.8 ± 1.7
4	11.5 ± 1.7	10.8 ± 1.3	15.6 ± 2.9	12.6 ± 2.9	13.4 ± 1.6	15.6 ± 2.6	15.3 ± 3.0	15.6 ± 1.8	14.7 ± 1.5
5	12.3 ± 1.5	15.1 ± 3.2	16.4 ± 1.7	13.7 ± 2.1	16.1 ± 1.4	14.3 ± 3.2	13.1 ± 3.0	15.9 ± 2.6	12.6 ± 2.1
6	15.7 ± 1.3	14.8 ± 2.7	17.9 ± 1.5	16.8 ± 1.8	15.0 ± 3.6	16.7 ± 2.2	14.1 ± 2.5	13.4 ± 2.5	16.0 ± 1.0
7	14.0 ± 1.1	14.0 ± 1.8	14.7 ± 1.7	13.6 ± 2.9	18.1 ± 2.9	17.5 ± 2.3	12.5 ± 1.9	16.4 ± 1.8	17.0 ± 2.5

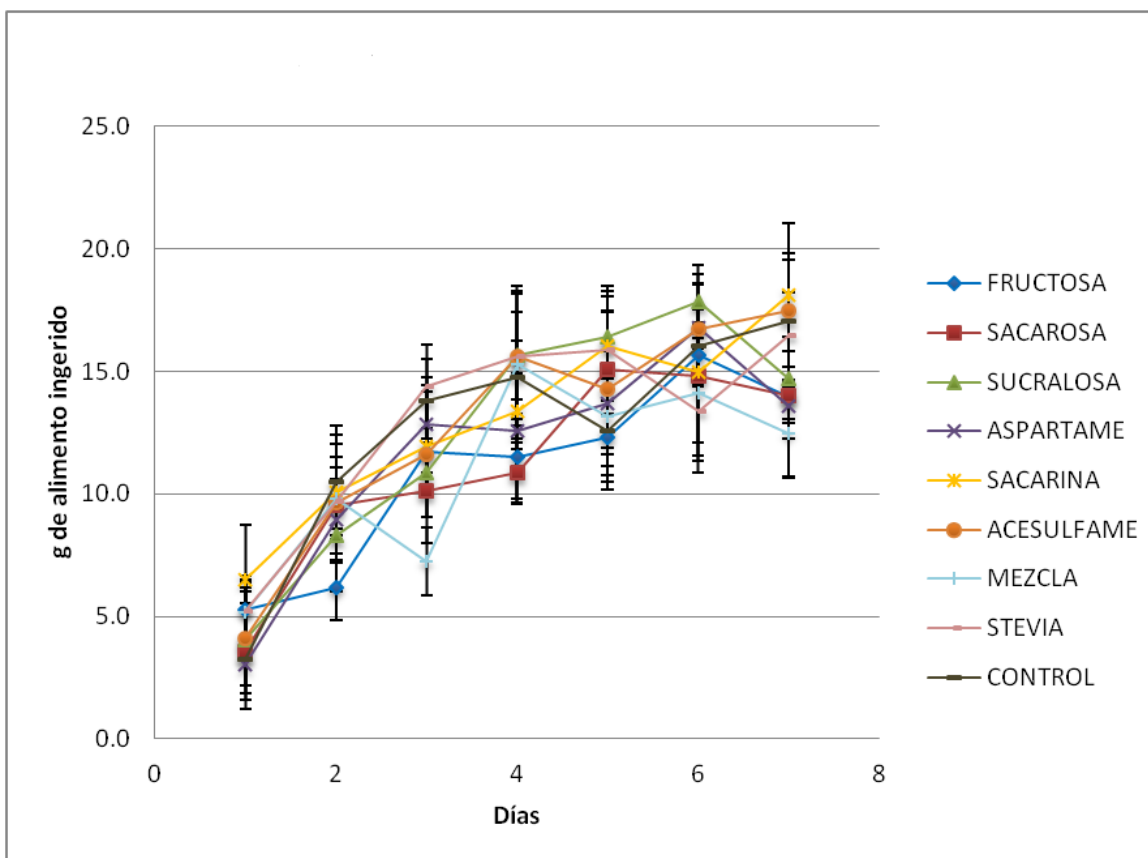


GRÁFICO 4.1. PROMEDIO DE ALIMENTO INGERIDO POR CADA GRUPO DE EDULCORANTE POR DÍA

Para saber si había una diferencia estadística entre los grupos de edulcorantes o los días, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) a dos vías, el cual se puede apreciar en la Tabla 4.2. Dado que el *Valor-P* de ambos factores fue menor a 0.05, se dice que si hubo una diferencia significativa tanto entre los grupos de edulcorantes como entre los días.

TABLA 4.2. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL ALIMENTO INGERIDO A DOS FACTORES CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Grupos de edulcorantes	349.83	8	43.73	9.67	0.0000
B: Días	8585.04	6	1430.84	316.28	0.0000
Interacciones AB	1054.47	48	21.97	4.86	0.0000
Residuo	2565.11	567	4.52		
Total (Corr.)	12554.5	629			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

Con la finalidad de conocer entre cuales grupos de edulcorantes existió una diferencia significativa, y la magnitud de la misma, se realizó la siguiente evaluación estadística de

Diferencia Mínima Significativa (*LSD* por *Least Significance Difference*, en inglés) apreciada en la Tabla 4.3.

TABLA 4.3. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (*LSD* por sus siglas en inglés) DEL ALIMENTO INGERIDO POR GRUPOS DE EDULCORANTES, RESULTADOS CON DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA

<i>Columna de contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
ACESULFAME – ASPARTAME	0.89	0.70
ACESULFAME – FRUCTOSA	1.68	0.70
ACESULFAME – MEZCLA	1.59	0.70
ACESULFAME – SACAROSA	1.48	0.70
ASPARTAME – FRUCTOSA	0.78	0.70
CONTROL – ASPARTAME	0.73	0.70
CONTROL – FRUCTOSA	1.51	0.70
CONTROL – MEZCLA	1.42	0.70
CONTROL – SACAROSA	1.32	0.70
SACARINA – ASPARTAME	1.10	0.70
SACARINA – FRUCTOSA	1.88	0.70
SACARINA – MEZCLA	1.79	0.70
SACARINA – SACAROSA	1.69	0.70
STEVIA – ASPARTAME	0.89	0.70
STEVIA – FRUCTOSA	1.68	0.70
STEVIA – MEZCLA	1.59	0.70
STEVIA – SACAROSA	1.48	0.70
SUCRALOSA – ASPARTAME	0.94	0.70
SUCRALOSA – FRUCTOSA	1.72	0.70
SUCRALOSA – MEZCLA	1.63	0.70
SUCRALOSA – SACAROSA	1.53	0.70

Con el análisis estadístico de la Tabla 4.3 en el cual sólo se incluyen las comparaciones que fueron estadísticamente significativas, se puede apreciar claramente que el alimento ingerido por los grupos de aspartame, fructosa, mezcla y sacarosa (lado derecho de la columna de contraste), fue menor significativamente al alimento que ingirieron los grupos: acesulfame,

control, sacarina, stevia y sucralosa. Estos resultados concuerdan parcialmente en un experimento similar pero a largo plazo (Guzmán y Jiménez, 2012), donde se reporta que los edulcorantes energéticos como la sacarosa, promovieron menores ingestas de alimento, con un promedio de 11.78g durante los 9 meses de experimentación, (el promedio de ingesta de este grupo durante los 7 días de experimentación en el presente ensayo fue de 11.1g, lo cual es muy parecido). Comparando la ingesta correspondiente al grupo de fructosa, Guzmán y Jiménez (2012) reportan un promedio de ingesta de alimento de 16.46g; sin embargo, añaden que ésta fue menor a la cantidad de alimento ingerida por el grupo control durante los 9 meses de experimentación. En el presente experimento la cantidad ingerida por el grupo de fructosa, aunque no fue de esa magnitud, también se encontró un comportamiento similar, ya que el promedio de ingesta de alimento del grupo de fructosa (10.96g) fue menor que la del grupo control (12.56g).

Tabla 4.4. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (*LSD* por sus siglas en inglés) DEL ALIMENTO INGERIDO POR DÍA

<i>Columna de contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
2 - 1	4.88	0.62
3 - 1	7.11	0.62
4 - 1	9.43	0.62
5 - 1	9.78	0.62
6 - 1	11.04	0.62
7 - 1	10.75	0.62
3 - 2	2.23	0.62
4 - 2	4.55	0.62
5 - 2	4.90	0.62
6 - 2	6.16	0.62
7 - 2	5.87	0.62
4 - 3	2.32	0.62
5 - 3	2.67	0.62
6 - 3	3.93	0.62
7 - 3	3.64	0.62
6 - 4	1.61	0.62
7 - 4	1.32	0.62
6 - 5	1.25	0.62
7 - 5	0.97	0.62

Notas: 1) El número 1 se refiere al día 1 de experimentación, el número 2 al día 2 y así sucesivamente

La diferencia principal entre el estudio a largo plazo mencionado de Guzmán y Jiménez (2012), además del tiempo que abarcó la presente investigación, la cual fue mucho menor, fue el

involucramiento de una restricción en el horario en el que les fue suministrado el alimento y la bebida, pero probablemente si la duración del experimento hubiera sido de por lo menos 7 días más, seguramente se hubieran obtenido resultados muy similares al estudio a largo plazo mencionado.

En cuanto a la diferencia significativa encontrada entre los días, reportada en la Tabla 4.4, se aprecia que el día uno fue significativamente menor a todos los demás, el día dos fue significativamente menor a todos los días posteriores, y así sucesivamente con dos excepciones en las que no se presentaron diferencias: entre los días 4 y 5, ni entre los días 6 y 7. De cualquier forma se podría presumir una tendencia de aumento de ingesta de alimento, que concuerda con un adecuado condicionamiento y con un aumento en los requerimientos energéticos de los roedores debido al crecimiento de las ratas que se encontraban en una etapa joven.

4.2 Determinación de la ingesta de bebidas endulzadas

En el Gráfico 4.2 y en la Tabla 4.5 se puede observar que el promedio de los mililitros tomados diariamente y por grupo fueron muy variados, pero es notable que el primer día fue en el que menos mililitros se registraron, probablemente debido a que las ratas no se habían percatado del cambio de la bebida desde temprano por lo que no tuvieron el tiempo suficiente para ingerir una mayor cantidad de bebida, pero conforme se fueron condicionando al horario restringido, al paso de los días tomaron una mayor cantidad de bebida con edulcorante si es que el sabor les agradaba.

Para determinar la existencia de una diferencia estadísticamente significativa entre la ingesta de bebidas de cada grupo o los días, se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) (Tabla 4.6) donde se encontró la existencia de una diferencia estadística significativa entre las bebidas ingeridas por los grupos de edulcorantes y entre los días, por lo que ambos se evaluaron con la prueba de Diferencia Mínima Significativa (*Least significance difference, LSD* por sus siglas en inglés) las cuales se aprecian en la Tabla 4.7 y en la Tabla 4.8.

TABLA 4.5. PROMEDIO DE BEBIDAS INGERIDAS EN MILILITROS POR LOS GRUPOS DE EDULCORANTES POR DÍA

GRUPOS DE EDULCORANTES									
DIAS	FRUCTOSA	SACAROSA	SUCRALOSA	ASPARTAME	SACARINA	ACESULFAME	MEZCLA	STEVIA	CONTROL
1	8.2±3.7	25.8±9.8	10.0±6.1	12.3±5.4	15.4±7.0	14.6±9.3	21.9±8.9	29.7±9.1	9.1±2.5
2	18.4±8.4	23.6±7.2	25.0±9.8	17.3±3.9	28.1±5.7	20.4±6.4	37.2±11.3	33.3±8.9	21.6±5.4
3	31.2±9.5	37.2±6.7	26.7±10.9	18.1±3.6	20.2±4.6	19.7±3.6	26.9±8.3	28.8±7.1	16.2±4.2
4	27.8±7.2	31.9±7.6	20.9±9.3	21.6±4.4	23.7±3.8	28.5±9.7	33.9±9.2	19.3±9.1	13.5±4.6
5	22.7±9.7	25.8±9.4	32.3±11.2	16.6±3.2	28.4±4.6	33.2±9.3	35.6±7.8	20.0±7.1	20.1±5.5
6	24.6±5.3	28.0±8.5	29.4±13.2	18.8±4.5	33.9±9.1	29.9±5.0	26.4±5.2	16.8±7.9	21.4±5.1
7	34.4±8.2	33.7±13.9	31.7±8.5	19.9±5.3	34.6±8.9	29.9±8.2	28.9±4.9	22.1±4.2	26.7±4.6

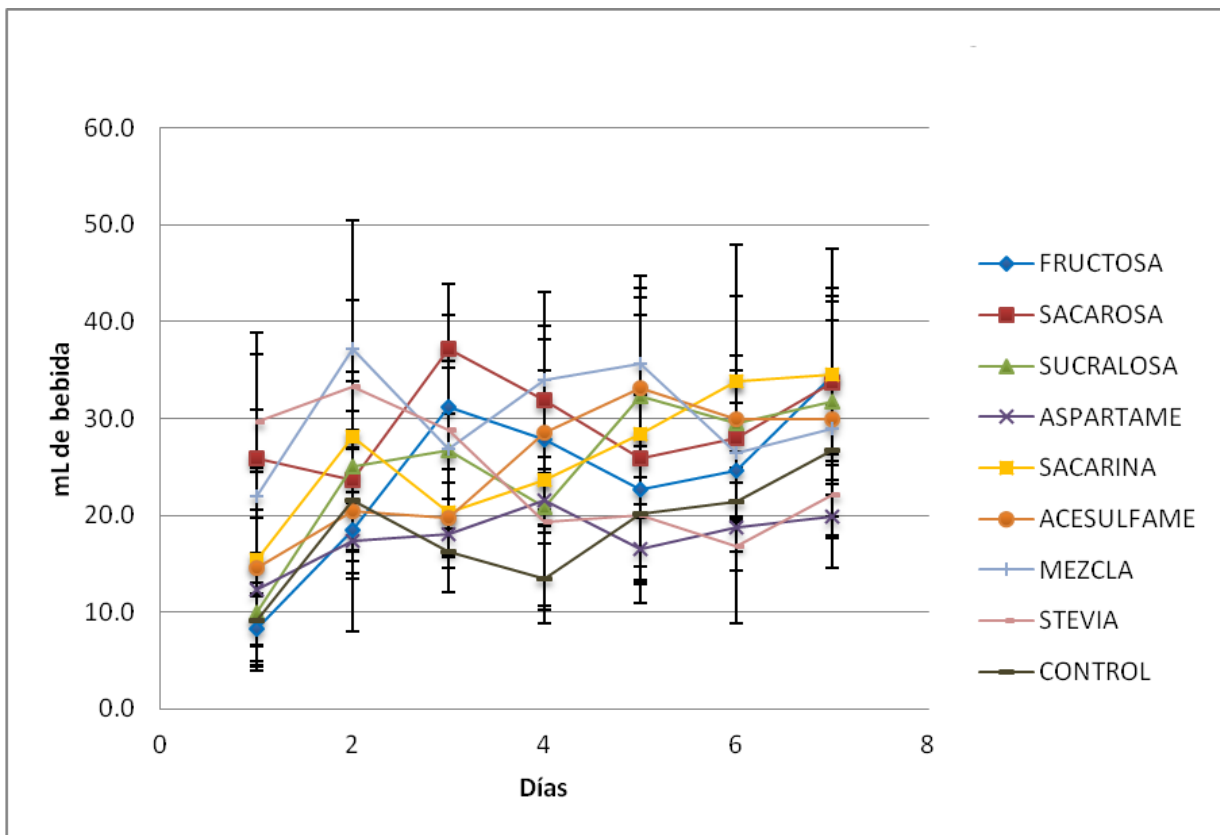


GRÁFICO 4.2. PROMEDIO DE BEBIDAS INGERIDAS POR LOS GRUPOS DE EDULCORANTES POR DÍA

TABLA 4.6. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA BEBIDA INGERIDA A DOS FACTORES CON UN 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Grupos de edulcorantes	6628.08	8	828.51	11.93	0.0000
B: Días	8655.71	6	1442.62	20.77	0.0000
Interacciones AB	19016.5	48	396.17	5.70	0.0000
Residuo	39390.9	567	69.47		
Total (Corr.)	73691.2	629			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

En el análisis estadístico de la Tabla 4.7, se aprecia que los grupos que ingirieron una menor cantidad de bebida fueron el grupo control y el de aspartame. Esto se debió seguramente a la falta de sabor dulce en la bebida, por lo que el único estímulo que tuvieron las ratas para tomar agua fue la sed.

Como afirman Brown y Rother (2012) el edulcorante hiponegético aspartame no estimula el receptor de sabor dulce en el ratón y es por esto que los roedores no presentan un comportamiento que responda al aspartame.

El grupo que más ingirió bebida con edulcorante fue el de sacarosa, pues los datos de este grupo demostraron ser significativamente mayores a todos los demás grupos exceptuando los grupos de mezcla y de sacarina. Observando en la Tabla 4.7 las diferencias mínimas significativas entre el grupo de sacarosa y el grupo control, fue de poco más de 11mL, la diferencia más amplia reportada. Al ser la diferencia significativa entre el grupo de mezcla de 9mL con respecto al grupo de control y la diferencia del grupo de la sacarina de 8mL con el grupo control, los convierte en los grupos con mayor diferencia significativa, y se entiende que al ser tan parecida la magnitud de la diferencia con respecto al grupo control de los grupos sacarosa, mezcla y sacarina, eso explica por qué no hubo diferencias significativas entre estos tres grupos.

Si se acomodan los grupos de edulcorantes en orden descendente con respecto a su diferencia con el grupo control, se tendría el siguiente orden de toma de bebida descendente: sacarosa,

mezcla, sacarina, sucralosa, acesulfame, stevia y fructosa. El único grupo que no presentó diferencia significativa con el grupo de control fue el grupo de aspartame.

Este comportamiento en cuanto a la ingestión de bebidas era el esperado, según lo reportado por Yarmolinsky *et al.* (2009): roedores ingenuos consumirán ávidamente soluciones dulces sobre el agua y siempre elegirán agua por encima de amargo, agrio y soluciones salinas concentradas.

Y ya que el aspartame no es dulce para los ratones, pues no estimula a los receptores T1R2 y T1R3 según Margolskee *et al.* (2007), se considera que este comportamiento también era el esperado en ratas.

Recordando el análisis de ingesta de alimento, se puede ver en general, que los grupos en los que se reporta una menor ingesta de alimento fueron los que reportaron una mayor toma de bebida, como son: mezcla y sacarosa, y viceversa, aquellos que reportaron una mayor ingesta de alimento, son los que tomaron menos bebida, como se observó en los grupos: control y stevia principalmente. Sólo los grupos de aspartame y fructosa fueron la excepción por reportar baja ingesta de alimento y bebida.

Se encontró un comportamiento similar, en los estudios realizados por Martínez *et al.* (2010) y Pérez y Reyes, (2010) con una duración de 3 meses encontrando una baja ingesta de alimento en aquellas ratas a las que se les administró fructosa, probablemente por el alto aporte calórico, su apetito se vió disminuido con una cantidad menor de bebida endulzada.

En cuanto al análisis de Diferencia Mínima Significativa (*Least significance difference, LSD* por sus siglas en inglés) entre los días, mostrado en la Tabla 4.8, se observó que el primer día fue significativamente menor a los demás, pudiéndose presumir un aumento de ingesta de bebida con el paso de los días ya que al llegar al día 7 resultó ser significativamente mayor a los días: 6, 4, 3 y 2.

TABLA 4.7. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (LSD por sus siglas en inglés) DE LA BEBIDA INGERIDA POR GRUPOS DE EDULCORANTES, DATOS CON DIFERENCIA ESTADÍSTICA SIGNIFICATIVA

<i>Columna de contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
ACESULFAME – CONTROL	6.8	3.10
ACESULFAME - ASPARTAME	5.15	3.10
FRUCTOSA - ASPARTAME	3.25	3.10
FRUCTOSA – CONTROL	4.9	3.10
MEZCLA-ASPARTAME	7.4	3.10
MEZCLA – CONTROL	9.04	3.10
MEZCLA – FRUCTOSA	4.14	3.10
MEZCLA - STEVIA	3.12	3.10
SACARINA - ASPARTAME	6.6	3.10
SACARINA – CONTROL	8.24	3.10
SACARINA – FRUCTOSA	3.34	3.10
SACAROSA – ACESULFAME	4.25	3.10
SACAROSA - ASPARTAME	9.41	3.10
SACAROSA – CONTROL	11.17	3.10
SACAROSA – FRUCTOSA	6.15	3.10
SACAROSA – STEVIA	5.14	3.10
SACAROSA – SUCRALOSA	4.04	3.10
STEVIA-ASPARTAME	4.27	3.10
STEVIA – CONTROL	5.91	3.10
SUCRALOSA – ASPARTAME	5.37	3.10
SUCRALOSA – CONTROL	7.01	3.10

TABLA 4.8. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (LSD por sus siglas en inglés) DE LA BEBIDA INGERIDA POR DÍAS

<i>Contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
2 - 1	9.67	2.44
3 - 1	9.18	2.44
4 - 1	8.02	2.44
5 - 1	10.45	2.44
6 - 1	9.18	2.44
7 - 1	12.68	2.44
7 - 2	3.01	2.44
7 - 3	3.5	2.44
7 - 4	4.66	2.44
7 - 6	3.5	2.44

Notas: 1) El número 1 se refiere al día 1 de experimentación, el número 2 al día 2 y así sucesivamente.

4.3 Determinación de la ganancia de masa corporal

Como se puede apreciar en la Tabla 4.9 y en el Gráfico 4.3, el hecho de que se desfasaran los días “1” de cada grupo de ratas hizo que existiera una diferencia en la masa inicial promedio de estas, es decir, los grupos que entraron al *rack* en días lunes (los grupos de fructosa, aspartame y mezcla), sólo experimentaron 3 días de adaptación con alimento “*ad libitum*”. Es por lo anterior, que los grupos de fructosa y mezcla coinciden en ser los grupos con la menor masa inicial en promedio; derivado de lo anterior, los grupos que entraron al *rack* en un día miércoles, tuvieron 5 días de adaptación con alimento “*ad libitum*”, como fueron: el grupo de la sucralosa, el acesulfame y el grupo control.

Las ratas de estos grupos presentaron en promedio una masa inicial mayor en comparación con los demás grupos de edulcorantes. Por lo tanto, se puede inferir que efectivamente aquellas ratas que tuvieron más días de adaptación con el alimento “*ad libitum*”, ganaron unos gramos de masa extra en comparación con las que tuvieron menos días de adaptación. En esta misma tabla se observa adicionalmente que el segundo y tercer día, todas las ratas en promedio, experimentaron una disminución de masa como se aprecia en el Gráfico 4.3, esto fue el tiempo que les llevó adaptarse al horario matutino, puesto que los roedores son animales que se alimentan y tienen mayor actividad por la noche, además de que la restricción de horario fue muy severa, lo que seguramente causó una disminución de masa de 10.80g en promedio, sólo entre el primer y segundo día; entre el segundo y tercer día la pérdida de masa fue mucho menor y no sucedió así en todos los grupos (Gráfico 4.4).

En los siguientes días la tendencia fue de aumento de masa, pero conforme a la masa del día anterior, es decir, en general fue hasta el séptimo día cuando lograron recuperar su masa inicial y en el octavo día fue cuando lograron sobrepasar su masa inicial en todos los grupos.

Es por lo anterior que se muestran los incrementos de masa entre los días, para que se puedan observar las diferencias entre los grupos eliminando la diferencia de masa inicial, como se muestra en la Tabla 4.10 y en el Gráfico 4.4.

TABLA 4.9. PROMEDIO DE LA MASA DE LAS RATAS EN GRAMOS DE LOS GRUPOS DE EDULCORANTES POR DÍA

GRUPOS DE EDULCORANTES									
DÍAS	FRUCTOSA	SACAROSA	SUCRALOSA	ASPARTAME	SACARINA	ACESULFAME	MEZCLA	STEVIA	CONTROL
1	140.9 ±5.3	149.2 ±10.1	154.6 ±14.1	150.0 ±4.7	155.4 ±4.8	162.1 ±6.7	142.4 ±8.4	149.9 ±10.7	156.8 ±10.3
2	134.8 ±4.9	138.5 ±7.1	147.5 ±6.7	137.6 ±4.9	142.6 ±5.5	147.5 ±6.2	134.6 ±7.5	138.9 ±7.6	142.0 ±8.7
3	130.5 ±5.3	140.7 ±7.5	145.0 ±5.8	135.5 ±4.5	141.6 ±5.2	146.8 ±5.6	135.2 ±6.4	137.7 ±6.7	141.8 ±7.9
4	135.7 ±5.9	141.0 ±7.3	146.0 ±5.9	137.9 ±4.9	142.2 ±5.6	147.7 ±7.1	135.9 ±6.6	141.9 ±6.9	144.5 ±7.2
5	136.5 ±6.0	142.3 ±8.3	150.1 ±6.6	140.6 ±5.7	145.9 ±5.3	152.5 ±7.4	141.0 ±6.8	145.8 ±6.2	146.2 ±6.9
6	139.8 ±5.4	146.9 ±9.5	154.2 ±7.4	144.0 ±5.8	152.4 ±5.7	156.4 ±9.2	144.1 ±6.6	148.5 ±7.2	150.7 ±5.9
7	144.7 ±5.7	151.5 ±10.9	161.3 ±6.7	151.5 ±5.7	156.1 ±7.4	161.6 ±9.4	146.1 ±7.6	153.6 ±8.4	155.5 ±5.8
8*	149.6 ±6.2	158.7 ±11.3	164.1 ±7.7	154.7 ±6.3	162.3 ±8.6	167.9 ±9.0	149.6 ±6.8	157.6 ±8.6	161.1 ±6.1

*Nota: Se incluye un día 8, el cual corresponde al día de la toma de muestra sanguínea

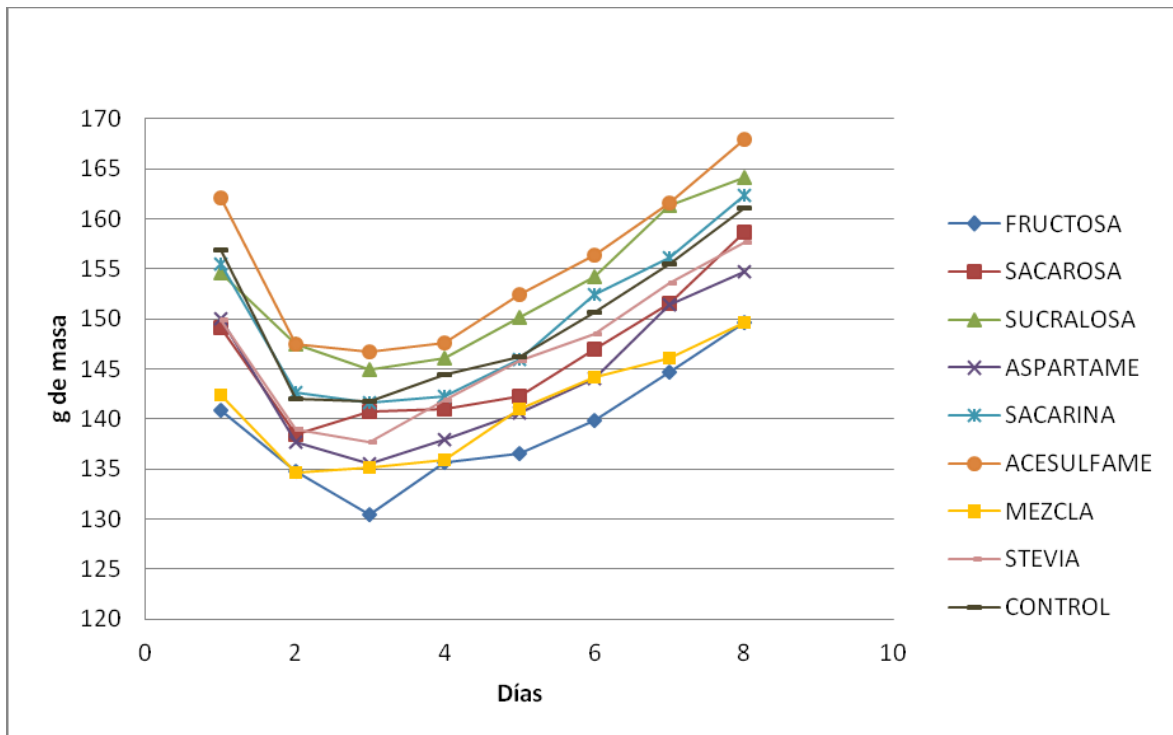
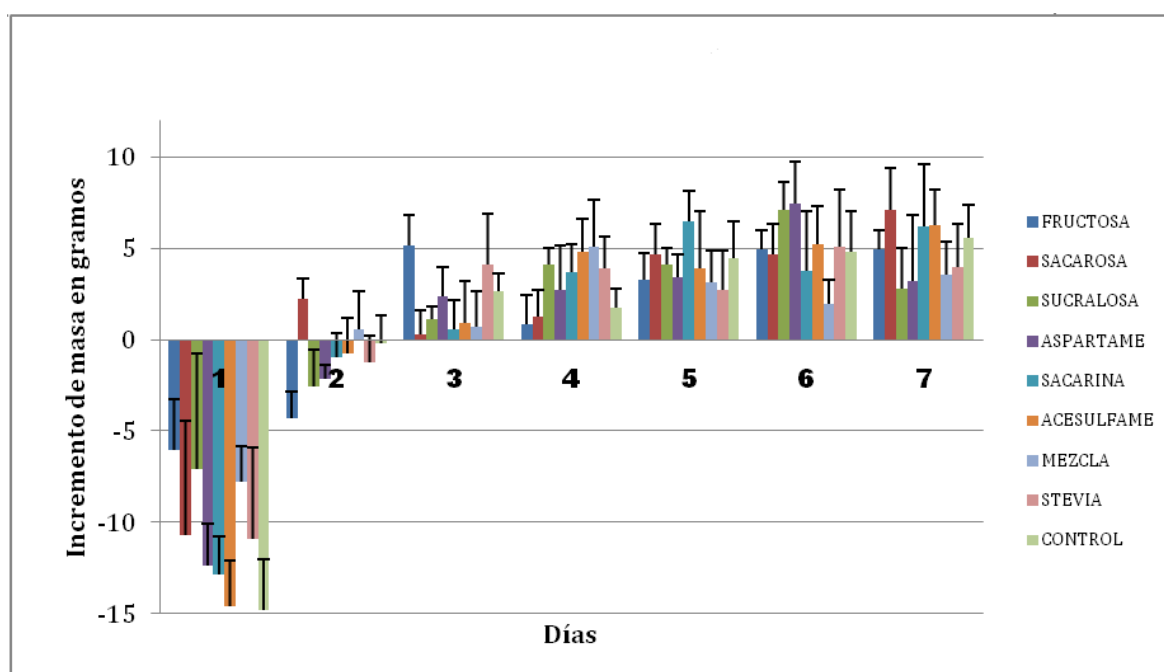


GRÁFICO 4.3. PROMEDIO DE LA MASA DE LAS RATAS DE LOS GRUPOS DE EDULCORANTES POR DÍA

TABLA 4.10. PROMEDIO DE LOS INCREMENTOS DE MASA EN GRAMOS DE LAS RATAS DE LOS GRUPOS DE EDULCORANTES POR DÍA

GRUPOS DE EDULCORANTES									
*	FRUCTOSA	SACAROSA	SUCRALOSA	ASPARTAME	SACARINA	ACESULFAME	MEZCLA	STEVIA	CONTROL
1	-6.03±2.8	-10.69±6.2	-7.07±6.3	-12.36±2.2	-12.84±2.1	-14.62±2.5	-7.8±1.9	-10.93±5.0	-14.83±2.8
2	-4.34±1.5	2.26±1.1	-2.55±2.0	-2.13±0.7	-0.96±1.3	-0.76±2.0	0.56±2.1	-1.22±1.4	-0.18±1.5
3	5.18±1.7	0.3±1.3	1.1±0.7	2.39±1.6	0.58±1.6	0.91±2.3	0.72±1.9	4.14±2.7	2.64±1.0
4	0.84±1.6	1.27±1.4	4.08±1.0	2.69±2.4	3.68±1.5	4.8±1.8	5.09±2.6	3.92±1.7	1.77±1.0
5	3.28±1.5	4.64±1.7	4.08±1.0	3.4±1.2	6.47±1.7	3.92±3.1	3.12±1.7	2.7±2.2	4.48±2.0
6	4.92±1.1	4.64±1.7	7.08±1.5	7.47±2.2	3.73±3.3	5.24±2.1	1.94±1.3	5.12±3.1	4.82±2.2
7	4.92±1.1	7.11±2.3	2.76±2.2	3.24±3.6	6.23±3.4	6.27±2.0	3.53±1.8	3.99±2.4	5.57±1.8

*Nota: Siendo el número “1” el incremento de masa entre el día 1 y el 2, y así sucesivamente. El número “7” corresponde al incremento entre el último día o día 7 y el día en que se les tomó la muestra de sangre, ya que este día también se pesaron los especímenes por la mañana. Los números negativos se obtienen los primeros días por la pérdida de masa que experimentaron las ratas debido a la repentina restricción en el horario de alimentación (9:00am a 3:00pm)



Nota: Siendo el número “1” el incremento de masa entre el día 1 y el 2 y así sucesivamente.

GRÁFICO 4.4. PROMEDIO DE INCREMENTOS DE MASA DE LAS RATAS DE LOS GRUPOS DE EDULCORANTES POR DÍA

Con los datos de los incrementos de masa promedio de cada grupo fue posible obtener la diferencia de masa entre los días del experimento independientemente de la masa inicial de la rata, por lo que este factor se convirtió en una magnitud comparable entre los grupos de

edulcorantes y fueron estos datos los que se analizaron estadísticamente para encontrar alguna diferencia significativa entre la ganancia o pérdida de masa como se aprecia en la Tabla 4.11.

TABLA 4.11. ANÁLISIS DE VARIANZA DE INCREMENTO DE MASA A DOS FACTORES CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: Grupos de edulcorantes	33.10	8	4.13	0.65	0.7374
B: Días	16593.5	6	2765.58	433.05	0.0000
Interacciones AB	1916.59	48	39.92	6.25	0.0000
Residuo	3620.99	567	6.38		
Total (Corr.)	22164.1	629			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$.

El análisis de varianza de la Tabla 4.11 en cuanto a los incrementos de masa de las ratas con un 95.0% de confianza no arrojó ninguna diferencia estadística significativa entre los grupos de edulcorantes, pero sí entre los días, por lo que se realizó una prueba de Diferencia Mínima Significativa (Least significance difference, *LSD* por sus siglas en inglés) para identificar entre qué días fue esa diferencia. La prueba se aprecia en la Tabla 4.12. La explicación de por qué no se encontró diferencia significativa entre los grupos de edulcorantes es ciertamente el corto tiempo de este experimento, pues en un estudio similar a largo plazo, Guzmán y Jiménez (2012) después de 9 meses de estudio, reportaron que los grupos de ratas que presentaron la mayor ganancia de masa corporal significativa fueron: la sal de acesulfame de K^+ y aspartame; hecho que se atribuye a que los edulcorantes artificiales son nutrimentalmente activos ya que pueden enviar señales a un sistema de recepción que incrementa la absorción de glucosa durante una comida (Mace *et al.*, 2007).

En el análisis de la Tabla 4.12, se observó que el número “1” fue significativamente menor a todos los demás números, como el “2” fue menor significativamente a todos los números posteriores, y así sucesivamente con excepción del número “6” en donde ya no se observó una diferencia significativa con el número “7”; recordando que los números son los incrementos de masa entre los días, (o decremento de masa como se presentó los primeros dos días) se puede afirmar que conforme pasaron los días, los incrementos se tornaron más positivos, es decir las ratas obtuvieron una ganancia de masa mayor comparada con la ganancia de masa del día

anterior, y fue a partir del 6^{to} al 8^o día donde ya no se presentó una diferencia significativa entre los incrementos.

TABLA 4.12. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (LSD por sus siglas en inglés) DE INCREMENTOS DE MASA POR DÍAS

<i>Contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
2 - 1	9.57	0.73
3 - 1	12.61	0.73
4 - 1	13.74	0.73
5 - 1	14.62	0.73
6 - 1	15.61	0.73
7 - 1	15.45	0.73
3 - 2	3.03	0.73
4 - 2	4.16	0.73
5 - 2	5.04	0.73
6 - 2	6.03	0.73
7 - 2	5.88	0.73
4 - 3	1.13	0.73
5 - 3	2.01	0.73
6 - 3	2.99	0.73
7 - 3	2.84	0.73
5 - 4	0.88	0.73
6 - 4	1.86	0.73
7 - 4	1.71	0.73
6 - 5	0.98	0.73
7 - 5	0.83	0.73

Nota: Siendo el número "1" el incremento de masa entre el día 1 y el 2 y así sucesivamente

4.4 Hallazgos bioquímicos

A continuación se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas al suero sanguíneo de las 90 ratas Wistar del experimento. Cabe recordar que la toma de muestra se realizó el octavo día de experimentación y que fue con tiempos muy bien controlados como se menciona en la metodología, los cuales se pueden apreciar en la Tabla 3.1 de la misma.

El análisis de la comparación de los parámetros bioquímicos se realizará tomando en consideración al grupo control, el cual durante todo el experimento ingirió agua purificada, ya que este grupo proporciona datos confiables conforme a la edad en que se encontraban las ratas Wistar antes de su sacrificio, es decir, no se compararán los resultados obtenidos contra los parámetros reportados para una rata Wistar adulta pues arrojaría un error experimental alto.

4.4.1 Determinación de la Hormona GIP (*glucose-dependent insulintropic polypeptide*, en inglés) en plasma sanguíneo

En la Tabla 4.13 se aprecian los valores de GIP para la condición ayuno y los valores de la condición edulcorante. Los datos en ayuno se encontraron dentro de un rango que va desde 30 hasta 43pmol/L, dicha variación de 13pmol entre los datos de cada grupo seguramente es debida a que sólo se midió el parámetro en una rata para cada edulcorante (n=1). Se puede considerar entonces a esta concentración de la hormona GIP como el valor basal después de 18 horas de ayuno.

TABLA 4.13. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN EN PLASMA DE GIP TOTAL EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE (pmol/L)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacarosa	Sucralosa	Acesulfame	Aspartame	Control	Mezcla	Sacarina	Stevia
Ayuno (n=1)	0	30.31	40.29	39.14	42.84	30.06	30.21	41.00	33.36	29.4
Edulcorante (n=3)	30	38.87 ± 15.1	48.16 ± 4.2	75.06 ± 18.0	17.97 ± 6.2	46.88 ± 11.1	26.77 ± 10.2	65.41 ± 1.9	42.7 ± 13.9	26.79 ± 4.2

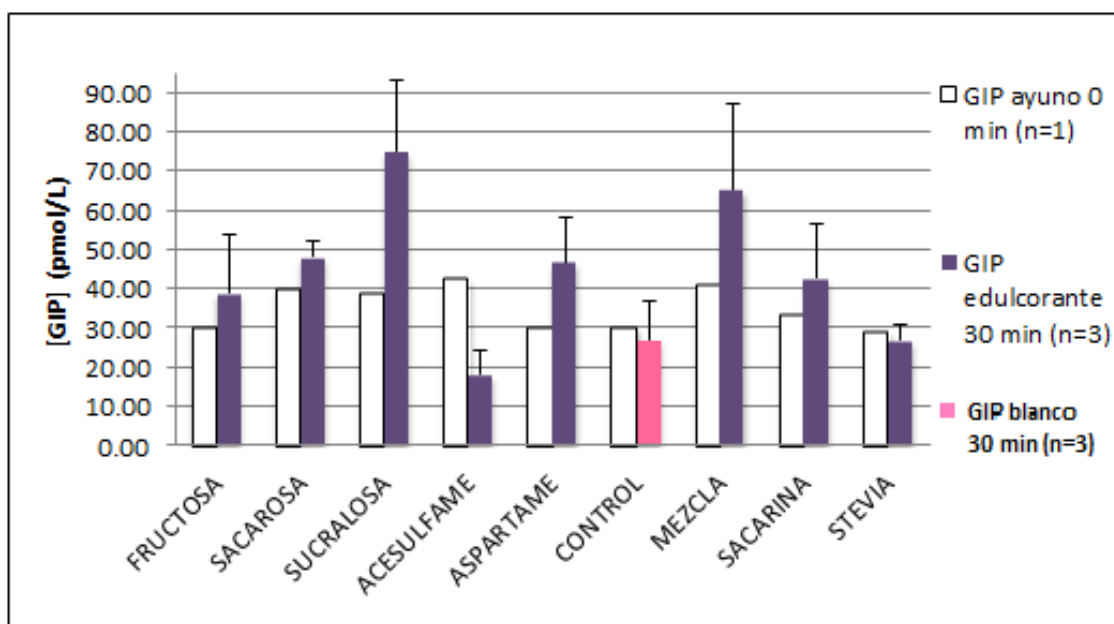


GRÁFICO 4.5. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GIP POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE

Para la condición edulcorante, que cabe recordar que fue aquella en la que se les administró a 3 ratas de cada grupo un mililitro de solución con edulcorante al 18% (por recomendación de los especialistas del INCMYNSZ), es decir 4.5g de edulcorante en 25mL ya que tenían que encontrarse todos a la misma concentración para poder comparar el efecto entre los mismos. En el Gráfico 4.5 se aprecia la variación de este parámetro a los 30 minutos después del suministro del edulcorante de golpe. La tendencia general que se observa a los 30 minutos es de aumento, siendo los edulcorantes sucralosa y mezcla los que muestran una mayor respuesta al estímulo, seguidos por los edulcorantes: sacarosa, aspartame, sacarina y fructosa en menor medida, todo lo anterior tomando al grupo control como referencia. El único grupo que disminuyó la concentración de GIP total a los 30 min fue el grupo de acesulfame, incluso con respecto a los valores encontrados en ayuno, lo cual es un comportamiento que no se esperaba y tendría que ser estudiado y/o repetido para poder ser explicado.

Cabe mencionar que para realizar el análisis de varianza, se utilizaron únicamente los datos a un $t=30$ min, con $n=3$ de cada uno de los edulcorantes, tomando como referencia al grupo control, puesto que a estas ratas solo se les suministró de golpe agua purificada a los 30 minutos; es decir, los datos correspondientes a la condición de ayuno no fueron utilizados para el análisis estadístico.

Los resultados del análisis de varianza de esta prueba se aprecian en la Tabla 4.14, y dado que el *valor-P* de la prueba resultó menor que 0.05, sí hubo una diferencia estadísticamente significativa entre la media de GIP entre un grupo de edulcorante y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

TABLA 4.14. ANÁLISIS DE VARIANZA DE GIP CONDICIÓN EDULCORANTE CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	8223.81	8	1027.98	6.07	0.0007
Intra grupos	3046.25	18	169.23		
Total (Corr.)	11270.1	26			

Para saber entre qué grupos existió diferencia significativa se realizó la prueba estadística de diferencia mínima significativa (*Least significance difference, LSD* por sus siglas en inglés). Los resultados se muestran en la Tabla 4.15 arrojando que sólo los grupos de **mezcla y sucralosa**

fueron significativamente mayores con respecto al grupo control y, por lo tanto, aquellos que se considerará que sí estimularán la secreción de la hormona GIP a los 30 minutos. Los demás edulcorantes no presentaron diferencia significativa con respecto al control, por lo que de esto se puede inferir que estos edulcorantes no son o no dan un estímulo suficiente para lograr la secreción de la hormona GIP de manera significativa al tiempo de 30 minutos.

Es necesario recordar que se suministró un mililitro de solución con edulcorante al 18% (0.18g de edulcorante en 1mL, por recomendación de los especialistas del INCMyNSZ), a ratas con una masa corporal promedio entre $147.2 \pm 8.3g$, lo que representa aproximadamente $1.22g \pm 0.07g$ de edulcorante por kg de masa corporal. En un estudio de Fujita *et al.* (2008) se evaluaron los edulcorantes acesulfame, stevia, sucralosa y glucosa, a concentración de 1g/kg en ratas en ayuno a $t=0$ y $t=30min$. A los 30min encontraron que solamente el edulcorante glucosa estimuló significativamente la liberación de GIP y GLP-1. En ese estudio se utilizó el edulcorante glucosa como control positivo por ser el glúcido que más estimula la liberación de estas hormonas, sin embargo en la presente investigación no se incluyó un grupo para probar al edulcorante glucosa sino sacarosa (glucosa-fructosa), lo cual limita la comparación.

Brown y Rother (2012) mencionan que, además del experimento de Fujita *et al.* (2008), existen cuatro experimentos similares pero en humanos sanos a quienes se les suministró oralmente sucralosa, aspartame y acesulfame y no mostraron efectos significativos sobre la secreción de las hormonas GLP-1, PYY, grelina o GIP. Es por esto que Brown y Rother (2012) apoyan la noción de que los edulcorantes no calóricos por sí solos no son suficiente estímulo para causar la secreción de hormonas intestinales *in vivo*. A pesar de lo anterior, se encontró evidencia en el presente estudio de que podría existir un efecto sinérgico entre la mezcla de edulcorantes (acesulfame y el aspartame) para lograr la liberación de la hormona GIP en ratas (efecto que no se observó de manera individual) y de que la sucralosa sí es suficiente estímulo para causar la secreción de la hormona GIP en ratas Wistar *in vivo*.

Aunado a lo anterior, existe evidencia *in vitro*, de que el poderoso edulcorante sucralosa provoca un aumento de la liberación de GLP-1 y GIP y una elevación del calcio intracelular (Margolskee *et al.* 2007). La secreción de la hormona GLP-1 se ve impedida por el inhibidor

del receptor dulce lactisol (Steinert *et al.*, 2011). Dicho en otras palabras, si el receptor del gusto dulce es inhibido por el lactisol y no es capaz de ser percibido entonces al edulcorante sucralosa, como consecuencia, no promovería la secreción de la hormona GLP-1 “*in vitro*”. Esto implicaría que existe una relación entre la percepción del gusto dulce y la secreción de esta hormona.

Haciendo un análisis más profundo, se sabe que algunos edulcorantes naturales y artificiales (por ejemplo, sacarosa, glucosa y sucralosa) se unen a los dominios tanto del receptor T1R2 como al receptor T1R3, ambos receptores del gusto dulce. Mientras que los edulcorantes dipeptídicos (por ejemplo, el aspartame y el neotamo) se unen sólo al dominio del receptor T1R2 (Fernstrom *et al.*, 2012). Surge entonces una hipótesis experimental: aquellos edulcorantes que son capaces de unirse a ambos receptores del sabor dulce, como son T1R2 y T1R3, serán los que logren estimular la secreción de las hormonas incretinas de manera significativa, aún si estos edulcorantes no son absorbidos por el organismo, como es el caso de la sucralosa. Para apoyar esta hipótesis, Fitch y Keim (2012) sostienen que la sinergia de los edulcorantes es porque se enlazan a ambos receptores o subunidades del gusto dulce. La vinculación a una subunidad activa da una respuesta dulce, mientras que la unión a la otra subunidad aumenta la respuesta al estímulo ya que actúa como un potenciador (Fitch y Keim, 2012).

Toda esta evidencia apunta a que aunque el aspartame no produzca la sensación de sabor dulce en ratas, probablemente se una a algún dominio del receptor T1R2, mientras que el edulcorante acesulfame se une al dominio T1R3, aumentando la respuesta, lo cual provocó una elevación significativa en la concentración de la hormona GIP cuando se suministró la mezcla de estos edulcorantes de un solo golpe empleando una cánula para tal finalidad.

Apoyando la hipótesis de que el acesulfame se une al dominio del receptor T1R3, Meyer y Brewer (2008) probaron la respuesta de acesulfame al gusto dulce en células que carecen de la subunidad T1R3, no habiendo respuesta al gusto dulce (Meyers y Brewer, 2008). De lo anterior se puede inferir que el acesulfame se une entonces exclusivamente al dominio del receptor T1R3 para activar su respuesta dulce. Para que la hipótesis experimental planteada fuera

aceptada en su totalidad, el edulcorante sacarosa debió haber arrojado datos estadísticamente significativos, pero ya que sólo se evaluó al tiempo de 30 minutos, es probable que su pico máximo se encontrara a otro tiempo y no a éste, por lo que para concluir si este edulcorante estimula de manera significativa la secreción de GIP o no, sería preciso evaluar su comportamiento tomando en cuenta un mayor número de tiempos como por ejemplo a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos. En cuanto a los demás edulcorantes (fructosa, acesulfame de potasio, aspartame, sacarina, stevia) al tiempo evaluado (t=30 min) no arrojaron diferencia significativa contra el grupo control, por lo que también resultaría interesante conocer su comportamiento a mayores intervalos (a los 10, 20, 30, 40, 50 y 60 minutos) y así comparar sus picos máximos de secreción de la hormona GIP.

TABLA 4.15. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (*LSD* por sus siglas en inglés) DE GIP POR EDULCORANTE

<i>Contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
Aspartame - Acesulfame	28.91	22.31
Mezcla - Acesulfame	47.45	22.31
Mezcla - Control	38.64	22.31
Mezcla - Fructosa	26.54	22.31
Mezcla - Sacarina	22.71	22.31
Mezcla - Stevia	38.63	22.31
Sacarina - Acesulfame	24.73	22.31
Sacarosa - Acesulfame	30.19	22.31
Sucralosa - Acesulfame	57.09	22.31
Sucralosa - Aspartame	28.17	22.31
Sucralosa - Control	48.28	22.31
Sucralosa - Fructosa	36.18	22.31
Sucralosa - Sacarina	32.35	22.31
Sucralosa - Sacarosa	26.89	22.31
Sucralosa - Stevia	48.27	22.31

A continuación, en la Tabla 4.16 se presentan los datos promedio de concentración de la hormona GIP correspondientes a la condición “comida”, es decir, las ratas de cada grupo a las que se les dio de comer y los 30 minutos se les tomó una muestra de sangre.

TABLA 4.16. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN EN PLASMA DE GIP TOTAL EN LA CONDICIÓN COMIDA Y EL PROMEDIO DE GRAMOS DE ALIMENTO INGERIDOS (pmol/L)

Condición	Ayuno (n=1)	Comida (n=3)	Gramos de alimento ingerido
Tiempo (min)	0	30	
Fructosa	30.31	75.23 ± 33.1	4.3 ± 0.4
Sacarosa	40.29	169.7 ± 13.2	4.0 ± 1.9
Sucralosa	39.14	203.7 ± 46.5	4.7 ± 1.3
Acesulfame	42.84	111.6 ± 24.8	2.2 ± 0.8
Aspartame	30.06	143.0 ± 29.6	3.0 ± 1.0
Control	30.21	93.93 ± 29.1	4.2 ± 0.7
Mezcla	41.00	142.0 ± 38.3	4.2 ± 0.9
Sacarina	33.36	160.1 ± 24.5	4.5 ± 0.6
Stevia	29.4	101.5 ± 39.4	2.9 ± 1.8

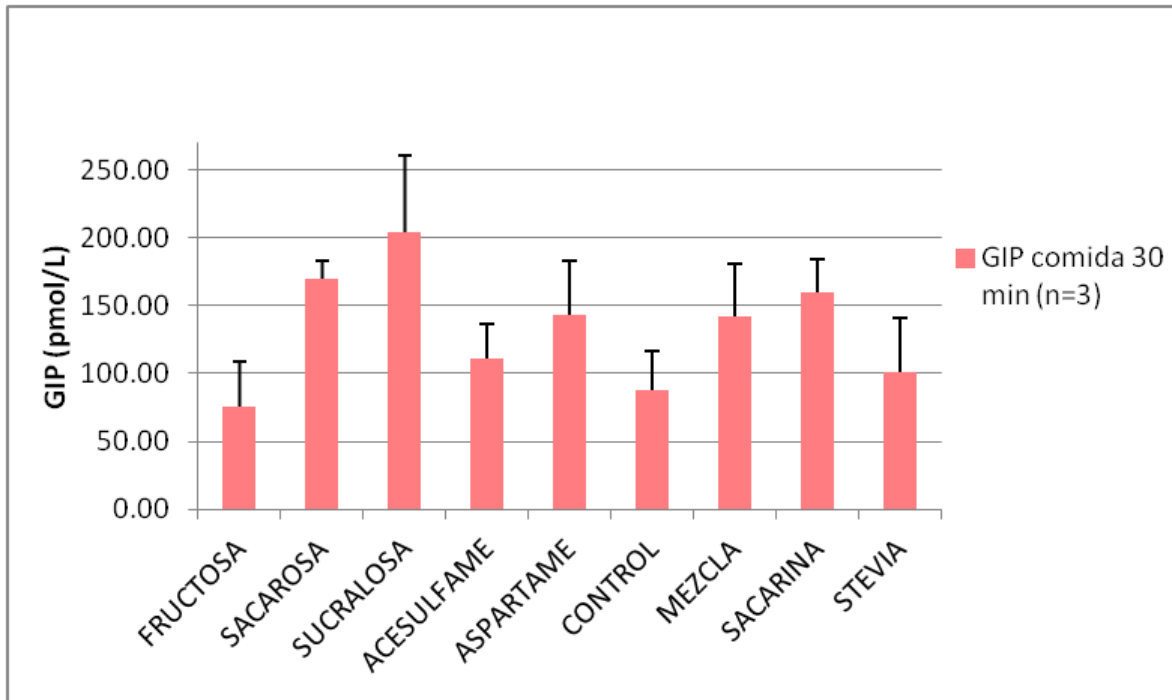


GRÁFICO 4.6. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GIP CON RESPECTO AL TIEMPO POR GRUPO DE EDULCORANTE EN LA CONDICIÓN COMIDA

Bajo esta condición, en el Gráfico 4.6 se observa cómo la presencia de alimento estimuló significativamente y en mayor medida la secreción de la hormona GIP, elevando su concentración en el plasma sanguíneo hasta 200pmol/L en los casos en que las ratas ingirieron una mayor cantidad de alimento. Es decir, comparado con los datos de las ratas en ayuno, el aumento de concentración de GIP en esta condición fue mucho más notable que en la condición

“edulcorante”, lo cual se esperaba por la composición de la comida que contiene tanto hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos que estimulan sobremanera la liberación de la hormona. Sin embargo, como se puede observar en la Tabla 4.16, donde se incluyen los gramos de alimento promedio ingeridos por las ratas, ninguna de ellas comió la misma cantidad de alimento, por lo tanto no se pueden realizar comparaciones a partir de estos datos, en consecuencia se procedió a dividir este parámetro entre la cantidad de alimento ingerido por cada rata, datos que se analizarán mas adelante.

En la Tabla 4.17 se encuentran los datos promedio de concentración de la hormona de GIP para la condición “comida + edulcorante”, es decir, las ratas a las que se les administró la misma concentración de edulcorante que en la condición “edulcorante” y además se les dejó comer alimento “ad libitum”, y al tiempo 30 minutos se les tomó la muestra de sangre vía ocular. También se incluyen los gramos de alimento promedio ingeridos por las ratas de cada grupo.

TABLA 4.17. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN EN PLASMA DE GIP TOTAL EN LA CONDICIÓN COMIDA CON EDULCORANTE Y EL PROMEDIO DE GRAMOS DE ALIMENTO INGERIDOS (pmol/L)

Condición	Ayuno (n=1)	Edulcorante + Comida (n=3)	Gramos de alimento ingerido
	0	30	
Fructosa	30.31	84.14 ^{±31.6}	3.2 ^{±0.2}
Sacarosa	40.29	214.14 ^{±39.7}	3.7 ^{±0.7}
Sucralosa	39.14	179.6 ^{±14.7}	3.8 ^{±0.9}
Acesulfame	42.84	135.6 ^{±20.2}	2.7 ^{±0.2}
Aspartame	30.06	140.3 ^{±34.0}	3.0 ^{±2.0}
Control	30.21	115.7^{±12.9}	4.8^{±0.2}
Mezcla	41.00	103.5 ^{±38.1}	3.1 ^{±1.5}
Sacarina	33.36	113.7 ^{±39.5}	3.1 ^{±1.3}
Stevia	29.4	101.1 ^{±17.1}	4.4 ^{±0.3}

En el Gráfico 4.7 se observa un incremento en la concentración de la hormona GIP bastante notable, ya que se alcanzaron niveles de hasta 200pmol/L de la hormona GIP, esto fue provocado por la estimulación del alimento ingerido y probablemente por la ingesta del edulcorante por las 3 ratas de cada grupo, pero como era de esperarse las ratas no consumieron la misma cantidad de alimento; por lo tanto, para poder comparar la posible diferencia de concentración de la hormona entre las condiciones “comida” y “edulcorante + comida”, es

decir las ratas que únicamente ingirieron alimento y las que ingirieron el edulcorante más el alimento, se procedió de dividir este parámetro entre los gramos de alimento ingerido por cada rata. En la Tabla 4.18 se presentan los cocientes promedio con sus desviaciones correspondientes.

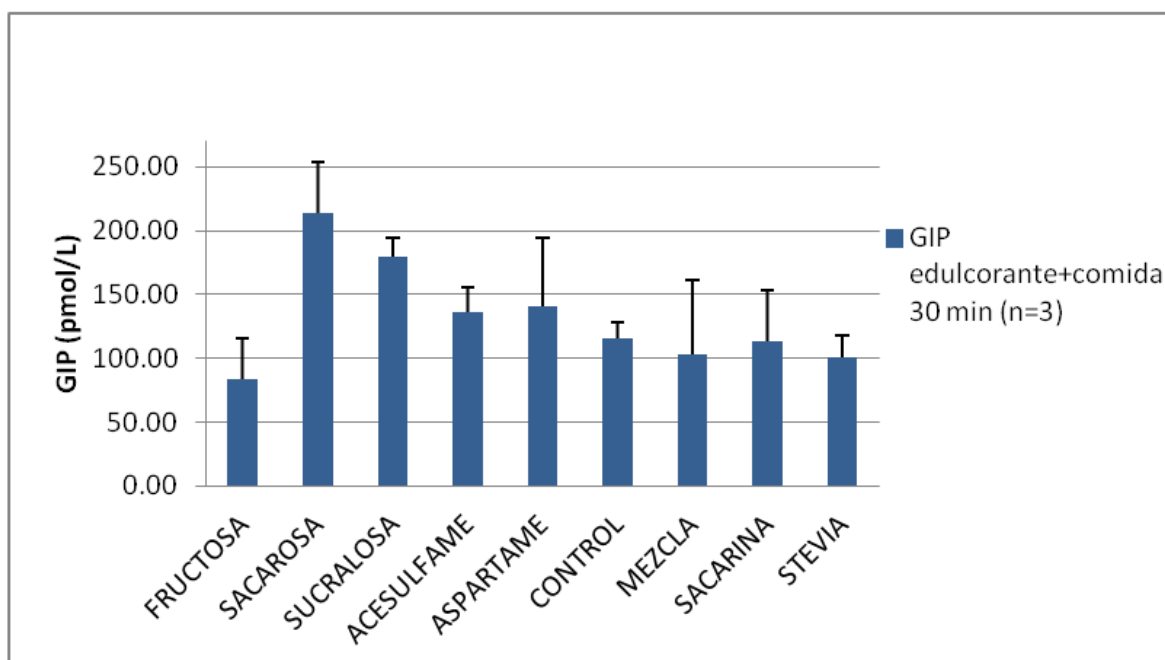


GRÁFICO 4.7. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GIP CON RESPECTO AL TIEMPO POR EDULCORANTE EN LA CONDICIÓN COMIDA CON EDULCORANTE

TABLA 4.18. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GIP TOTAL POR GRAMO DE ALIMENTO INGERIDO EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA (pmol/Lg)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacarosa	Sucralosa	Acesulfame	Aspartame	Control	Mezcla	Sacarina	Stevia
Comida /g (n=3)	30	17.20 ±7.1	53.99 ±27.4	44.26 ±7.3	52.29 ±6.6	53.81 ±15.4	20.37 ±3.9	34.10 ±5.4	36.32 ±9.9	39.66 ±12.3
Edul+comida/g (n=3)	30	25.95 ±8.3	59.5 ±12.7	48.70 ±9.2	46.20 ±10.6	58.88 ±17.1	23.90 ±2.1	32.55 ±4.1	32.55 ±5.2	23.13 ±2.6

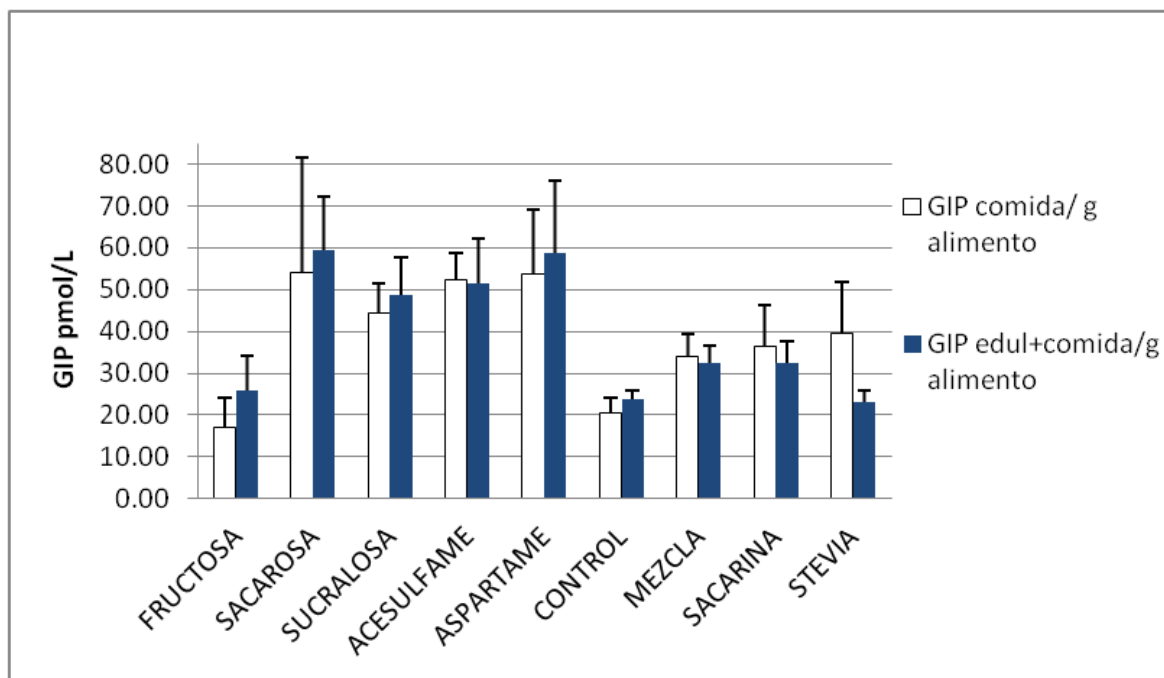


GRÁFICO 4.8. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GIP POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA

En el Gráfico 4.8 se aprecia que los grupos de sacarosa, aspartame, acesulfame y sucralosa estimularon en mayor medida la liberación de GIP por gramo de alimento ingerido pero en ambas condiciones. Por ello, para saber si existieron diferencias significativas entre las condiciones o entre los grupos de edulcorantes, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), que se reporta en la Tabla 4.19. Éste arrojó diferencias significativas únicamente entre los edulcorantes y no entre las condiciones (“comida” y “comida con edulcorante”). Sin embargo, el objetivo primordial era observar si existían diferencias entre las condiciones, para evaluar si la administración de los edulcorantes era capaz de causar algún efecto aditivo sobre la secreción de la hormona GIP en conjunto con el alimento. De cualquier forma se realizó la prueba de Diferencia Mínima Significativa (*Least significance difference, LSD* por sus siglas en inglés) el cual se reporta en la Tabla 4.20, donde se aprecia que los grupos sacarosa, sucralosa, acesulfame y aspartame estimularon significativamente más la secreción de GIP por gramo de alimento ingerido que los grupos de fructosa, control, mezcla, sacarina y stevia en ambas condiciones. Para el caso de la condición comida con edulcorante esta diferencia entre los grupos podría ser explicada con base en la hipótesis ya mencionada en la condición edulcorante, pues los edulcorantes ingeridos con la comida podrían afectar de manera sinérgica

la respuesta al estímulo de la comida: sacarosa y sucralosa uniéndose a ambos receptores del gusto dulce (T1R2 y T1R3); acesulfame y aspartame uniéndose únicamente a un solo receptor (T1R2 ó T1R3) pero intensificando la respuesta. Sin embargo, el edulcorante mezcla no dio resultados estadísticamente significativos como se esperaría con base en la hipótesis anterior, por lo que ésta es una vertiente interesante para continuar realizando otros estudios para validar la hipótesis. En ellos deberá controlarse de manera más estricta el consumo de alimento y, de preferencia, a distintos tiempos para poder realizar comparaciones más precisas.

TABLA 4.19. ANÁLISIS DE VARIANZA DE GIP POR GRAMO DE ALIMENTO A DOS FACTORES CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Condición	3.58	1	3.58	0.02	0.8823
B:Edulcorante	9224.71	8	1153.09	7.13	0.0000
RESIDUOS	7118.6	44	161.78		
TOTAL (CORREGIDO)	16346.9	53			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

Por otro lado, contrario a lo que se esperaba, la condición comida por gramo de alimento también presentó diferencias significativas entre estos cuatro grupos (acesulfame, aspartame, sacarosa y sucralosa) y el grupo de control. Esto podría deberse a la falta de control del suministro de alimento, no sólo en la cantidad, sino principalmente en la tasa de ingesta. A pesar de que se registró la cantidad ingerida de alimento por cada rata, no hubo manera de controlar el tiempo en el que ingirieron este alimento, ya que unas lo podían consumir dentro de los primeros minutos y otras podían dejar pasar mas minutos, lo que ocasionó alta dispersión entre los valores de GIP y como consecuencia falta de correlación entre los resultados.

Lo interesante de los resultados anteriores es que resulta importante hacer énfasis entre la gran diferencia que se encontró entre el estímulo que puede causar la administración de un edulcorante a alta concentración y el estímulo que causa el alimento que ingirieron las ratas. La máxima concentración de hormona GIP que se halló para la condición edulcorante fue de: $75.06 \pm 18.0 \text{ pmol/L}$, mientras que la máxima concentración de GIP para la condición comida que se encontró fue de: $214.14 \pm 39.7 \text{ pmol/L}$ debida a la ingesta de $3.7 \pm 0.7 \text{ g}$ de alimento. Lo anterior revela el hecho de que si bien algunos edulcorantes pueden causar la secreción de la hormona GIP “in vivo” cuando se les administra en altas concentraciones, no logran ejercer el

mismo efecto que el observado con la administración del alimento en ratas y, muy probablemente, en humanos pudiera presentarse el mismo fenómeno.

TABLA 4.20. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (*LSD* por sus siglas en inglés) DE GIP POR EDULCORANTE

<i>Contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
Acesulfame - Control	29.79	14.80
Acesulfame - Fructosa	30.35	14.80
Acesulfame - Mezcla	18.65	14.80
Acesulfame - Sacarina	17.49	14.80
Acesulfame - Stevia	20.53	14.80
Aspartame - Control	34.21	14.80
Aspartame - Fructosa	34.77	14.80
Aspartame - Mezcla	23.07	14.80
Aspartame - Sacarina	21.91	14.80
Aspartame - Stevia	24.94	14.80
Sacarosa - Control	34.62	14.80
Sacarosa - Fructosa	35.18	14.80
Sacarosa - Mezcla	23.48	14.80
Sacarosa - Sacarina	22.32	14.80
Sacarosa - Stevia	25.35	14.80
Sucralosa - Control	24.35	14.80
Sucralosa - Fructosa	24.91	14.80
Sucralosa - Stevia	15.08	14.80

4.5 Determinación de insulina en plasma sanguíneo

Los valores promedio de la concentración de insulina en plasma sanguíneo bajo la condición “edulcorante” se muestran en la Tabla 4.21 con su correspondiente desviación estándar y se comparan con los valores de concentración de insulina para la condición en ayuno. Estos últimos van desde 0.45ng/mL hasta 1.12ng/mL, lo que es un rango muy amplio. Como solamente se utilizó una rata por cada grupo para esta condición, esto podría explicar la variación. Si se observan los datos correspondientes a la condición ayuno en el Gráfico 4.9, el valor en ayuno de insulina para estas ratas debe hallarse realmente entre 0.64 y 0.86ng/mL, pues son las ratas con los datos de insulina más cercanos a la media y el control arroja un valor de 0.71ng/mL. Para la condición “edulcorante”, a los 30 minutos se observó de igual forma un

rango muy amplio de respuesta, siendo los grupos de acesulfame, sacarosa y aspartame los que presentaron una mayor concentración de insulina en sangre, como se aprecia en el Gráfico 4.9.

TABLA 4.21. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN EN PLASMA DE INSULINA EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE (ng/mL)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacarosa	Sucralosa	Acesulfame	Aspartame	Control	Mezcla	Sacarina	Stevia
Ayuno (n=1)	0	0.45	0.71	0.79	1.12	0.64	0.71	0.74	0.86	0.68
Edulcorante (n=3)	30	0.47 ±0.3	1.03 ±0.4	0.56 ±0.1	1.13 ±0.4	0.90 ±0.2	0.54 ±0.3	0.56 ±0.1	0.80 ±0.3	0.73 ±0.3

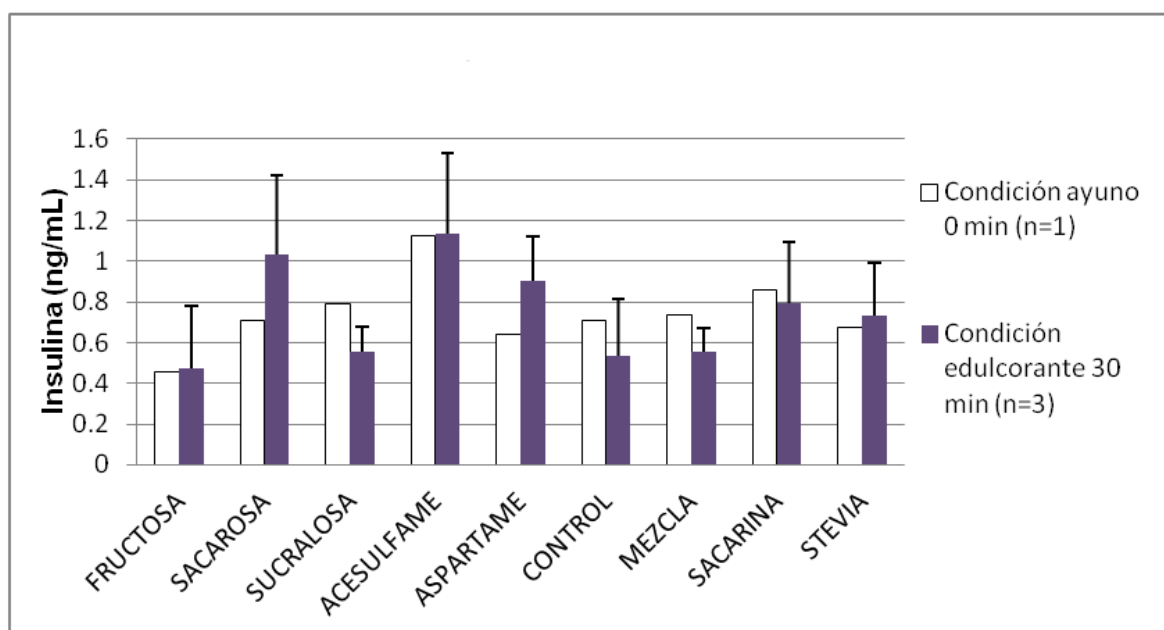


GRÁFICO 4.9. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE

Con la finalidad de evaluar la existencia de una diferencia significativa entre los grupos de edulcorantes o las condiciones de ayuno y edulcorante, se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) de los datos correspondientes a la condición “edulcorante”, el cual se presenta en la Tabla 4.22. Es decir, los datos pertenecientes a la condición ayuno no fueron analizados estadísticamente por provenir de una n=1. Los mismos datos de la condición “edulcorante” fueron utilizados para el análisis de Diferencia Mínima Significativa (*LSD*, por sus siglas en

inglés) utilizando como referencia al grupo control, por ser el grupo que ingirió durante todo el experimento agua purificada y poseer datos por triplicado. Dicho análisis no arrojó diferencia significativa entre los grupos de edulcorantes, probablemente debido a la alta dispersión de los datos. Lo esperado en este caso hubiera sido que sí existiera una diferencia significativa entre los grupos, y que los grupos de sucralosa y de mezcla mostraran una mayor concentración de insulina en sangre, precisamente por ser aquellos grupos en los que se encontró una mayor concentración de GIP total. Esto no se observó y la causa más probable de que no resultara el comportamiento esperado según expertos del Laboratorio de Fisiología de la Nutrición en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCM y NSZ) es que para que exista un efecto sobre la concentración de insulina en sangre debido a la secreción de la hormona GIP, se debe rebasar un umbral de concentración de esta última. Es decir, los edulcorantes calóricos o no calóricos no son suficiente estímulo por si mismos para modificar significativamente la concentración de insulina a los 30 minutos de suministro.

TABLA 4.22. ANÁLISIS DE VARIANZA DE INSULINA CONDICIÓN EDULCORANTE CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1.34	8	0.16	1.82	0.1387
Intra grupos	1.65	18	0.09		
Total (Corr.)	2.99	26			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

Para los datos de insulina en las condiciones comida y edulcorante con comida, tomando en cuenta que el parámetro insulina es proporcional a los gramos de alimento ingeridos, es decir, entre más gramos de alimento haya ingerido la rata, mayor será el valor arrojado de insulina, pero debido a que ninguna rata ingirió la misma cantidad de alimento, para realizar el análisis de estos datos, se procedió a dividir los valores obtenidos de insulina para estas condiciones entre los gramos de alimento ingeridos por cada rata, siendo este cociente el que se reporta a continuación en la Tabla 4.23, así como sus desviaciones correspondientes. Los valores promedio de insulina del grupo control para las dos condiciones se encontraron entre 0.49 y 0.60ng/mL por gramo de alimento, con una desviación de 0.3 y 0.2 puntos respectivamente.

TABLA 4.23. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA POR GRAMO DE ALIMENTO INGERIDO EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA (ng/mLg)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacarosa	Sucralosa	Acesulfame	Aspartame	Control	Mezcla	Sacarina	Stevia
Comida/ g alim. (n= 3)	30	0.69 ±0.2	0.91 ± 0.4	0.52 ± 0.1	0.85 ± 0.1	0.66 ± 0.2	0.49 ±0.3	0.60 ±0.2	0.88 ±0.3	0.78 ±0.4
Edul+comida/g alim. (n=3)	30	0.63 ±0.2	0.82 ± 0.2	0.49 ± 0.1	0.92 ± 0.2	0.59 ± 0.3	0.60 ±0.2	0.77 ±0.1	0.67 ±0.2	0.59 ±0.3

Como se puede apreciar en el Gráfico 4.10, el único grupo cuyos valores se encontraron por debajo del grupo control fue el grupo de la sucralosa, todos los demás parecieron estar por encima del control, sin embargo las desviaciones estándar fueron altas, por lo que se procedió a realizar el análisis estadístico para buscar diferencias significativas.

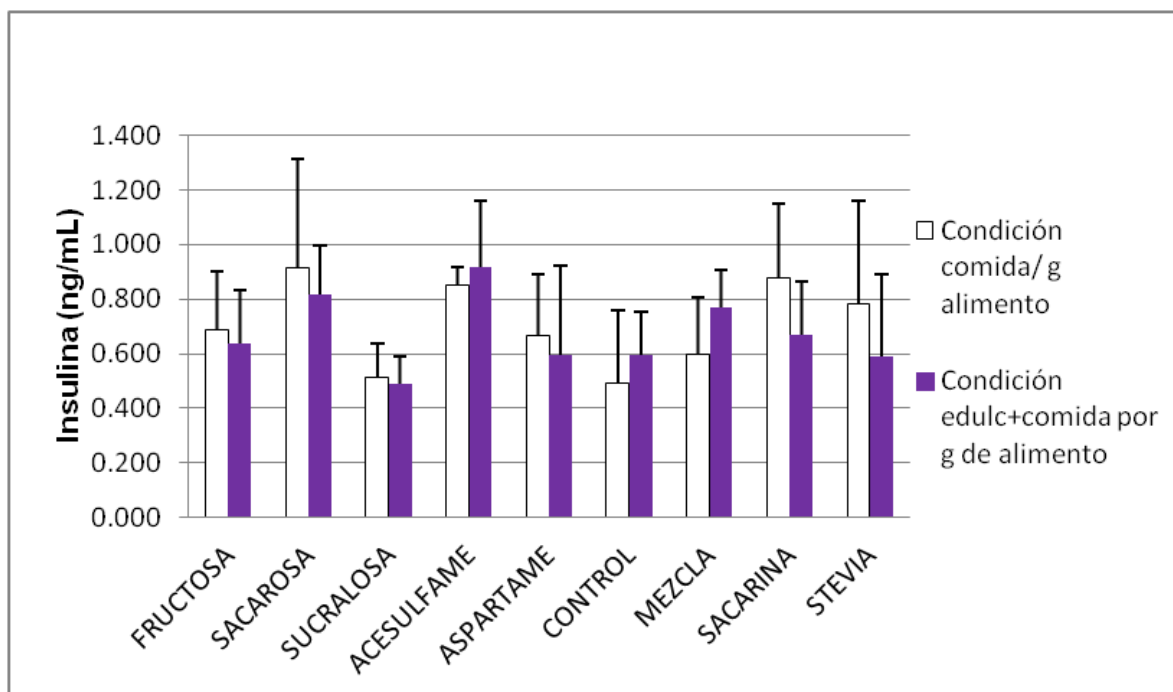


GRÁFICO 4.10. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE INSULINA POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA

TABLA 4.24. ANÁLISIS DE VARIANZA DE INSULINA POR GRAMO DE ALIMENTO A DOS FACTORES CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Condición	0.00	1	0.00	0.02	0.8986
B:Edulcorante	0.69	8	0.08	1.05	0.4147
RESIDUOS	3.61	44	0.08		
TOTAL (CORREGIDO)	4.30	53			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

Después de realizar el análisis de varianza de los datos correspondientes a ambas condiciones reportado en la Tabla 4.24, no se encontró diferencia significativa entre las dos condiciones por gramo de alimento ni entre los grupos de edulcorantes, por lo que se puede señalar que el suministro de los edulcorantes con el alimento no afectó de manera estadísticamente significativa la concentración de insulina de las ratas macho Wistar a los 30 minutos de administración.

4.4.3 Determinación de glucosa en el plasma sanguíneo

En la Tabla 4.25 puede apreciarse que los valores promedio de la concentración de glucosa medidos en la condición “ayuno” fluctuaron entre los 91.00 y los 124.0 mg/dL, lo cual es un intervalo amplio. Lo interesante es que se encontraron dentro de los valores de glucosa en ayuno esperados de manera normal para una rata Wistar sana. Lo anterior se corroboró según lo reportado por Urzúa (2011), quien establece los criterios de diagnóstico para determinar la existencia de Diabetes mellitus en ratas Wistar. Las siguientes son las cifras parámetro después de un ayuno nocturno de 12 horas:

- 1.- Niveles de glucosa en ratas aparentemente sanas: 100 a 115mg/dL
- 2.- Glucemia basal alterada: ≥ 126 pero < 140 mg/dL
- 3.- Intolerancia a la glucosa: ≥ 140 pero < 200 mg/dL
- 4.- Diagnóstico Diabetes mellitus: ≥ 200 mg/dL

TABLA 4.25. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN EN PLASMA DE GLUCOSA EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE (mg/dL)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacaro-sa	Sucra-losa	Acesul-fame	Aspar-tame	Control	Mezcla	Sacari-na	Stevia
Ayuno (n=1)	0	91.00	96.04	114.00	111.50	104.00	95.55	112.0	111.5	124.0
Edulcorante (n=3)	30	127.0 ±27	151.5 ±25.5	121.1 ±52.3	125.7 ±23.9	128.8 ±8.1	95.9 ±14.5	87.1 ±18.5	104.4 ±5.1	129.7 ±25.3

Para la condición de edulcorante, los valores promedio de concentración de glucosa al tiempo de 30 minutos se encontraron en el intervalo que va desde 87.1mg/dL hasta los 151.5mg/dL, dicho intervalo es amplio pero revela el estímulo provocado por los edulcorantes administrados. En el Gráfico 4.11 se pueden apreciar los grupos que parecen presentar una elevación en la concentración de glucosa en sangre al tiempo de 30 minutos. Estos fueron en orden descendente los siguientes: sacarosa, fructosa, y en menor grado: stevia, aspartame, acesulfame, y el grupo de la sucralosa.

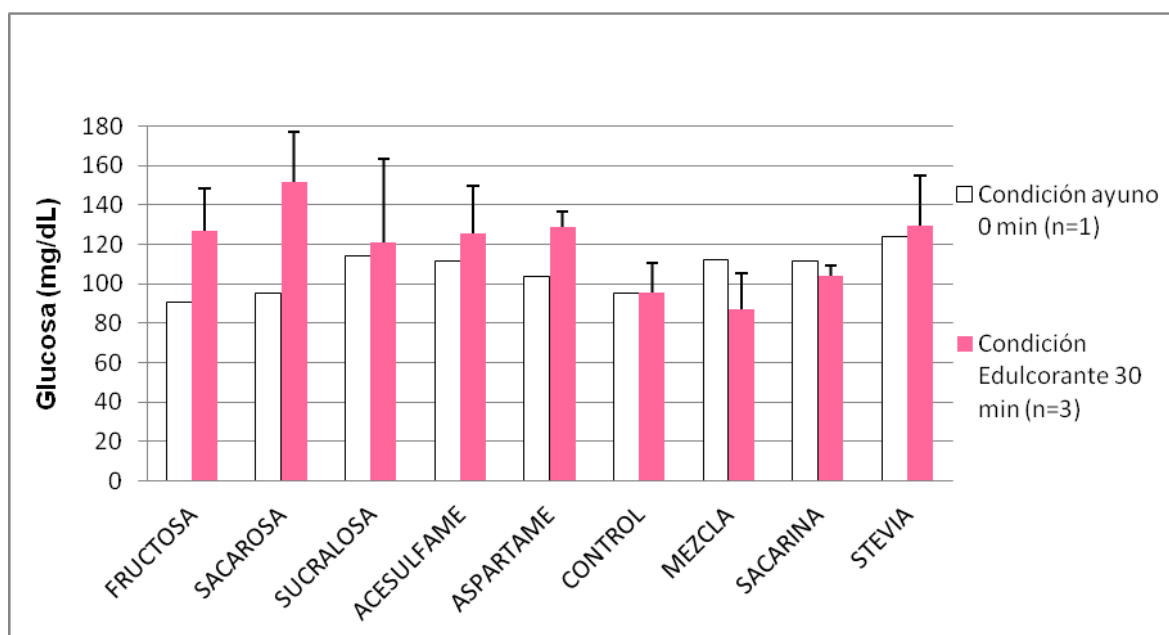


GRÁFICO 4.11. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE

Como en cada determinación se realizó el análisis de varianza (ANDEVA) entre los datos correspondientes a la condición “edulcorante”, para saber si había diferencia entre los grupos o

entre las condiciones, los resultados revelaron que si existió diferencia significativa entre los grupos de edulcorantes probados sobre el parámetro medido, en este caso glucosa en sangre. El análisis estadístico se encuentra a continuación en la Tabla 4.26.

TABLA 4.26. ANÁLISIS DE VARIANZA DE GLUCOSA CONDICIÓN EDULCORANTE CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	9436.64	8	1179.58	2.38	0.0599
Intra grupos	8903.7	18	494.65		
Total (Corr.)	18340.3	26			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

Para saber entre qué grupos de edulcorantes hubo una diferencia estadística significativa, se realizó la prueba de Diferencia Mínima Significativa (*Least significance difference, LSD* por sus siglas en inglés), que se muestra en la Tabla 4.27. El único grupo que presentó una diferencia significativa con respecto al control fue el grupo de la **sacarosa**, lo cual se esperaba ya que la sacarosa es un edulcorante calórico que al hidrolizarse aporta glucosa al organismo.

TABLA 4.27. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (*LSD* por sus siglas en inglés) DE GLUCOSA POR EDULCORANTE

<i>Contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
Acesulfame - Mezcla	38.55	38.15
Aspartame - Mezcla	41.71	38.15
Sacarosa - Control	55.63	38.15
Fructosa - Mezcla	39.88	38.15
Sacarosa - Mezcla	64.38	38.15
Stevia - Mezcla	42.55	38.15
Sacarosa - Sacarina	47.13	38.15

De acuerdo con los resultados para GIP, los edulcorantes de sucralosa y mezcla estimularon mayoritariamente su secreción. Por lo tanto, se esperaba que arrojaran significativamente valores más elevados de insulina y, en el caso de la determinación de glucosa, los valores resultarán ser menores que el control.

Como se menciona anteriormente, en la determinación de insulina no se encontraron diferencias significativas, pero en el caso específico de la determinación de glucosa en sangre para la condición edulcorante, el grupo de mezcla presentó valores promedio de glucosa menores estadísticamente que los grupos acesulfame, aspartame, fructosa, sacarosa y stevia, aunque no menores que el grupo control.

Por lo tanto, ningún edulcorante no calórico alteró de manera significativa la concentración basal de glucosa en sangre y, en cuanto a la fructosa, la cual también es un edulcorante calórico, se sabe que se absorbe de manera más lenta que la glucosa pues tiene un índice glicémico de tan sólo 23 (Casanueva, 2008). Y es por esto que no se esperaba que la fructosa aumentara de manera significativa la concentración de glucosa en sangre.

TABLA 4.28. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA EN PLASMA SANGUÍNEO POR GRAMO DE ALIMENTO INGERIDO EN LAS CONDICIONES DE COMIDA Y DE EDULCORANTE CON COMIDA (mg/dLg)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacarosa	Sucralosa	Acesulfame	Aspartame	Control	Mezcla	Sacarina	Stevia
Comida/g alimento (n=3)	30	27.83 ±5.3	33.91 ±19.6	27.37 ±14.6	39.32 ±10.00	41.12 ±13.1	24.58 ±4.5	23.03 ±4.6	31.03 ±2.6	44.32 ±17.3
Educ+comid a/g alimento (n=3)	30	34.91 ±2.9	30.82 ±11.2	37.57 ±16.4	42.54 ±1.0	26.8 ±6.2	24.58 ±4.1	35.72 ±12.2	30.78 ±7.4	36.97 ±8.5

La condición comida por gramo de alimento se aprecia en el Gráfico 4.12 en donde podría haber diferencia con respecto al control en los grupos de acesulfame, aspartame y stevia. Y, para la condición edulcorante con comida por gramo de alimento, podría haber diferencia con respecto al control en los grupos fructosa, sucralosa, acesulfame, mezcla y stevia. Sin embargo, después de realizar un análisis de varianza a dos vías, es decir, para saber si existe una diferencia significativa entre las condiciones de comida y de comida con edulcorante o entre los grupos de edulcorantes, se realizó un análisis de varianza a dos vías la cual se muestra en la Tabla 4.29. Se aprecia que ninguno de los dos factores presentó alguna diferencia significativa sobre la concentración de glucosa en el plasma sanguíneo bajo estas condiciones.

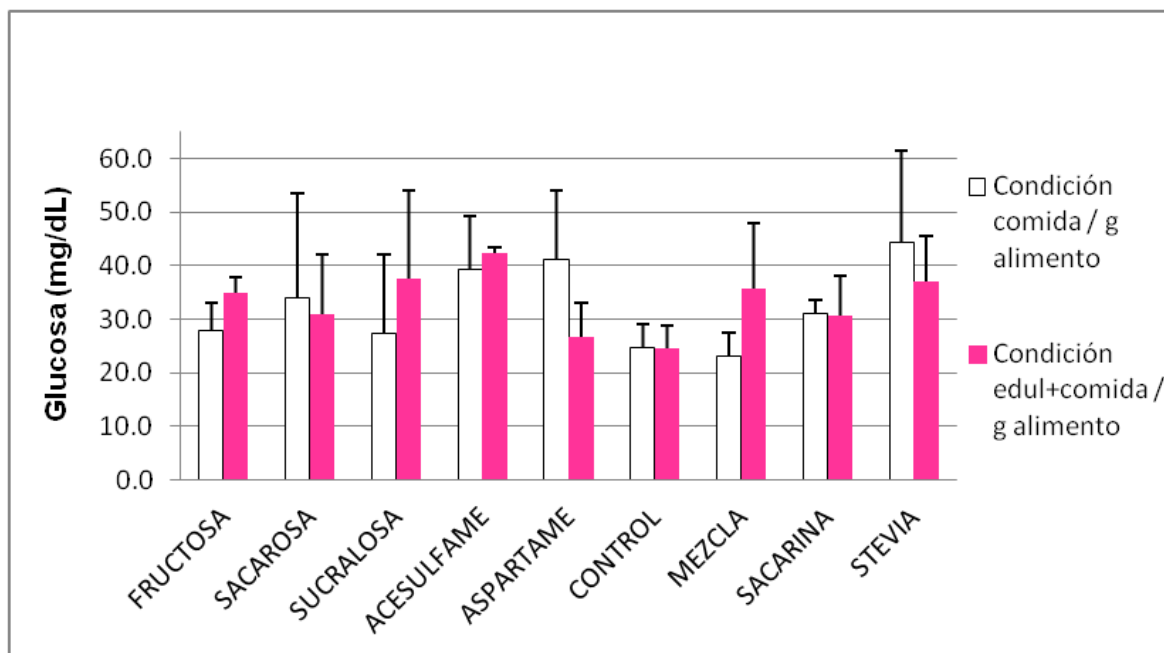


GRÁFICO 4.12. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUCOSA POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA

TABLA 4.29. ANÁLISIS DE VARIANZA DE GLUCOSA POR GRAMO DE ALIMENTO A DOS FACTORES CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Condición	10.66	1	10.66	0.08	0.7737
B:Edulcorante	1274.24	8	159.28	1.25	0.2942
RESIDUOS	5609.07	44	127.47		
TOTAL (CORREGIDO)	6893.97	53			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

Margolskee *et al.* (2007) quienes experimentaron con ratones durante 2 semanas, suministrándole a un grupo una dieta rica en hidratos de carbono (70% de sacarosa) y a otro grupo una dieta pobre en hidratos de carbono (1.9% de sacarosa), encontraron que la cantidad de ARNm (ARN mensajero) para formar la proteína SGLT1 (proteína transportadora de glucosa) intestinal, en el caso de la dieta rica en carbohidratos fue de 1.6 veces mayor ($P = 0,003$) que la encontrada en los ratones alimentados con una dieta pobre en hidratos de carbono. Además, mantuvieron ratones de tipo silvestre y ratones modificados (gen anulado para gustducina y receptor del gusto dulce T1R3) durante 2 semanas, en dos grupos, el primer grupo con una dieta baja en carbohidratos y al otro grupo le agregaron sucralosa al agua (2mM *ad libitum*). Para los ratones de tipo silvestre que tomaron sucralosa, hubo un aumento de 2.1 veces en la expresión de ARNm para SGLT1 y un incremento de 2.2 veces en la proteína

SGLT1 comparado con el control de los ratones modificados. La magnitud de estos cambios fue similar a los cambios producidos en la dieta rica en hidratos de carbono la cual contenía los edulcorantes naturales. En cuanto a aquellos ratones modificados que se les suministró sucralosa, no presentaron incrementos en la expresión de ARNm para SGLT1 o la proteína SGLT1.

Lo anterior apoya la hipótesis de que la Gustducina y el receptor T1R3 forman parte de la maquinaria dentro de la mucosa del intestino delgado que regula la expresión de la proteína SGLT1 en respuesta a azúcares de la dieta (Margolskee *et al*, 2007). Y ya que el cotransportador de Na⁺/glucosa ó SGLT1 es la principal vía para el transporte de azúcares de la dieta desde el lumen del intestino hacia el interior de los enterocitos, se podría esperar que en estudios *in vivo* en donde se administren edulcorantes ya sean calóricos o no calóricos, por lo menos durante dos semanas en alta concentración, se encontraría una diferencia en la absorción de glucosa proveniente de la dieta.

En cuanto al presente estudio no se midió la proteína SGLT1 ó el ARNm; sin embargo, se esperaba encontrar alguna evidencia de que una dieta dulce, ya sea de edulcorantes calóricos, o no calóricos, por un lapso de una semana fuera suficiente para revelar una mayor absorción de glucosa proveniente de los alimentos en ratas, observando por lo tanto una diferencia significativa entre los grupos de edulcorantes y el grupo control, ya que este último no estuvo expuesto a ningún edulcorante durante toda la experimentación. A pesar de no haberse encontrado diferencia estadística significativa, si se observa el Gráfico 4.12, todos los grupos de edulcorantes reportan una mayor concentración de glucosa por gramo de alimento ingerido que el reportado por el grupo control, de lo anterior, se puede especular que si la duración del experimento se hubiera extendido por otra semana seguramente se hubieran encontrado diferencias estadísticas significativas.

4.4.4 Determinación de triglicéridos en plasma sanguíneo

En la Tabla 4.30, se aprecia que en general los valores de triglicéridos en sangre para todos los grupos, no se dispersaron por más de 10 unidades de los valores encontrados en el grupo control. Con excepción al de sucralosa y al de la mezcla, ambos grupos en la condición

edulcorante reportaron valores más bajos de triglicéridos en comparación con el grupo control. Estos grupos fueron los mismos que lograron estimular de manera modesta la secreción de la hormona GIP y, por lo tanto, se podría pensar en que podría existir alguna relación entre los mencionados edulcorantes: mezcla y sucralosa y el metabolismo de los lípidos; sin embargo, se requeriría llevar a cabo estudios posteriores para corroborar esta hipótesis.

TABLA 4.30. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS EN PLASMA EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE (mg/dL)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacarosa	Sucralosa	Acesulfame	Aspartame	Control	Mezcla	Sacarina	Stevia
Ayuno (n=1)	0	45.30	40.32	41.47	45.93	44.05	39.74	45.37	40.02	43.23
Edulcorante (n=3)	30	37.47 ±6.0	43.95 ±4.5	25.26 ±2.2	40.04 ±7.4	34.41 ±8.7	41.47 ±4.3	24.80 ±5.3	32.40 ±5.9	41.98 ±6.3

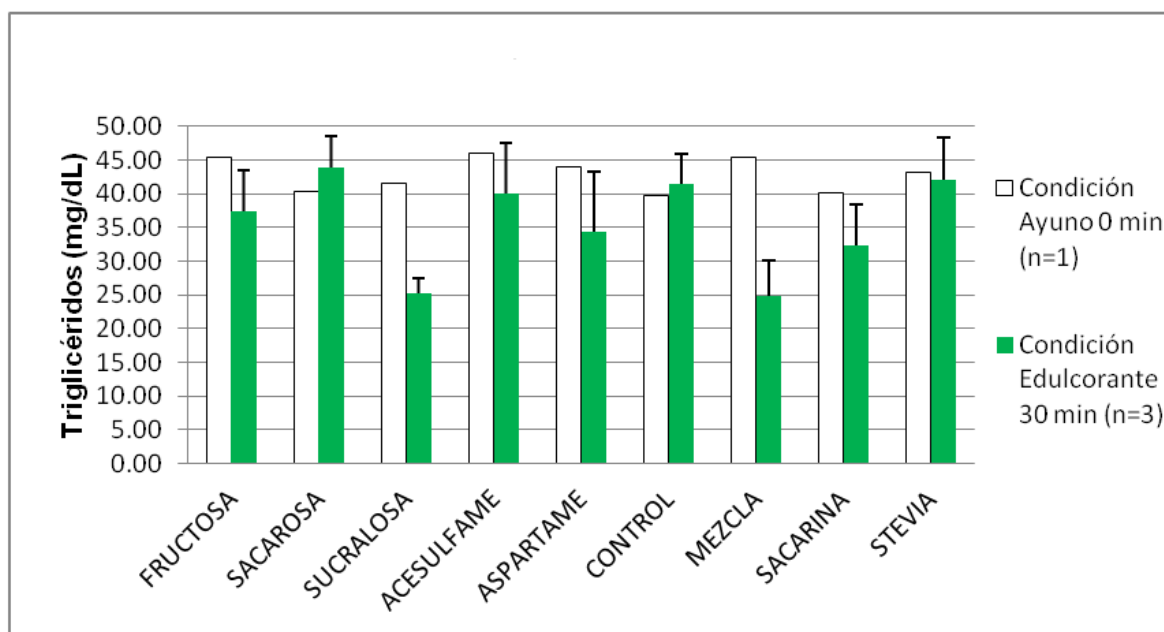


GRÁFICO 4.13. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE

De cualquier forma, el objetivo principal de medir los triglicéridos en sangre de las ratas era el de corroborar lo que mucho se menciona sobre el consumo de fructosa, que causa hipertriacilglicerolemia en modelos animales, de entre otros trastornos metabólicos mencionados por Elliot *et al.* (2002) y Johnson *et al.* (2007), como son hiperinsulinemia, resistencia a la glucosa e hipertensión. Sin embargo, por el poco tiempo que duró el experimento y como se observa en el Gráfico 4.13, la fructosa ni ningún otro edulcorante provocaron un nivel sobresaliente superior de triglicéridos en sangre para ninguna condición, por lo que para saber si efectivamente no había diferencias estadísticas significativas se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), el cual se aprecia en la Tabla 4.31 y corrobora que ningún edulcorante presentó diferencias estadísticas significativas con respecto al grupo de control para la condición edulcorante a los 30 minutos de suministro. Por otro lado, cabe mencionar que se observa una disminución en los triglicéridos con respecto al control principalmente en las ratas a las que se les suministraron los edulcorantes mezcla y sucralosa, mismos que lograron una significativa aunque modesta secreción de la hormona GIP, de este fenómeno se podría presumir alguna presunta relación entre estos edulcorantes y el metabolismo de los lípidos que sería muy interesante estudiar posteriormente, sin embargo por el escaso tiempo que duró la investigación es difícil de aseverar que existe una relación real entre la liberación de la hormona y una disminución de los triglicéridos en plasma.

Otra punto interesante es que el metabolismo de los triglicéridos para poder llevarse a cabo se requieren más de 30 minutos entre el suministro del estímulo y la respuesta fisiológica, siendo esta la razón principal por la que no se pudo observar una elevación o disminución significativa de este parámetro ya que se requerirían de varias tomas de muestra sanguínea (quizás a los 60, 90 y 120 minutos) para poder encontrar los picos máximos.

TABLA 4.31. ANÁLISIS DE VARIANZA DE TRIGILCÉRIDOS CONDICIÓN EDULCORANTE CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1209.02	8	151.12	2.39	0.0592
Intra grupos	1136.71	18	63.15		
Total (Corr.)	2345.73	26			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

A continuación se reportan los datos de concentración de triglicéridos correspondientes a las condiciones de comida y de edulcorante con comida ambas por gramo de alimento ingerido, se incluyen además las desviaciones estándar en la Tabla 4.32.

TABLA 4.32. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS POR GRAMO DE ALIMENTO INGERIDO EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA (mg/dLg)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacaro-sa	Sucra-losa	Acesul-fame	Aspar-tame	Control	Mezcla	Sacari-na	Stevia
Comida /g alim. (n= 3)	30	14.4 ±3.2	16.0 ±6.7	10.4 ±4.1	26.9 ±6.9	13.1 ±6.6	13.6 ±4.6	11.4 ±3.4	11.1 ±1.9	16.0 ±7.2
Edul+comida/ g alim. (n=3)	30	16.5 ±4.8	7.0 ±2.6	10.6 ±4.4	18.5 ±6.4	8.2 ±1.6	10.3 ±2.1	19.5 ±6.5	12.7 ±3.4	9.5 ±2.6

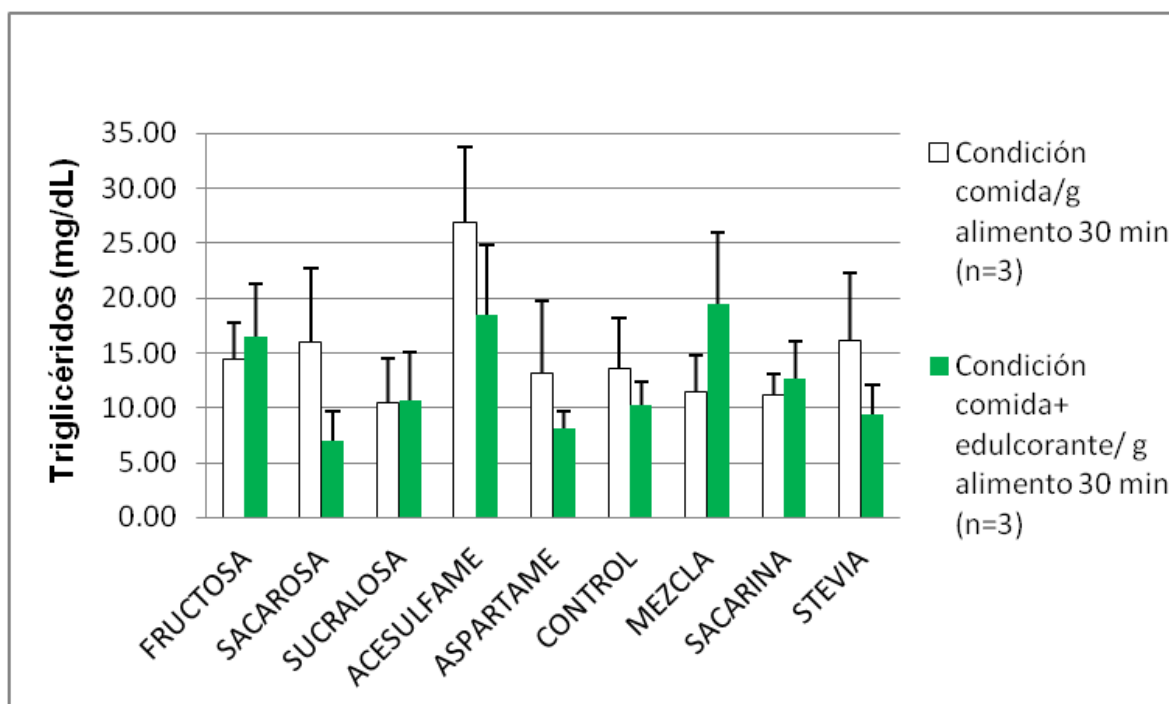


GRÁFICO 4.14. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA

De acuerdo con el Gráfico 4.14 se observa para la condición comida que los valores promedio de triglicéridos pertenecientes al grupo de acesulfame resultaron aparentemente mayores a los del grupo de control, los demás grupos fluctuaron en un rango aproximado de entre 15 a 20mg/dL por gramo de alimento ingerido. En el caso de la condición edulcorante con comida, se observa que los grupos acesulfame y mezcla fueron sobresalientes con respecto al grupo

control. Sin embargo, al realizar un análisis de varianza a dos vías, el resultado arrojado fue que no hubo diferencia significativa entre las condiciones ni entre los grupos de edulcorantes, como se visualiza en la Tabla 4.33.

Se esperaba que por lo menos el grupo de fructosa de la condición comida con edulcorante presentaría valores promedio mayores estadísticamente significativos, por lo que mencionan Adams *et al.* (2008) en cuanto al contexto de una comida, que la ingesta de fructosa ya sea por sí mismo o en jarabe de maíz, puede dar lugar a aumentos sostenidos de los niveles de triglicéridos postprandiales.

TABLA 4.33. ANÁLISIS DE VARIANZA DE TRIGLICÉRIDOS POR GRAMO DE ALIMENTO A DOS FACTORES CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Condición	70.36	1	70.36	1.67	0.2033
B:Edulcorante	709.73	8	88.71	2.10	0.0558
RESIDUOS	1855.97	44	42.18		
TOTAL (CORREGIDO)	2636.07	53			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

4.4.5 Determinación de colesterol en plasma sanguíneo

La última determinación de la presente investigación fue la de colesterol, en la Tabla 4.34 se encuentran los datos promedio de las condiciones ayuno y edulcorante con su correspondiente desviación estándar. Se puede observar en el Gráfico 4.15 que los valores en ayuno variaron desde los 1.5 mmol/L hasta los 2.2 mmol/L, lo cual no es un intervalo muy amplio, es decir, hubo poca variación en la respuesta entre los grupos.

TABLA 4.34. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN EN PLASMA DE COLESTEROL EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE (mmol/L)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacarosa	Sucralosa	Acesulfame	Aspartame	Control	Mezcla	Sacarina	Stevia
Ayuno (n=1)	0	1.69	1.77	1.50	2.18	1.83	2.03	1.55	1.81	1.81
Edulcorante (n=3)	30	1.79 ± 0.2	1.52 ± 0.3	1.78 ± 0.1	1.83 ± 0.2	1.66 ± 0.2	1.92 ± 0.2	1.65 ± 0.3	1.67 ± 0.0	1.61 ± 0.2

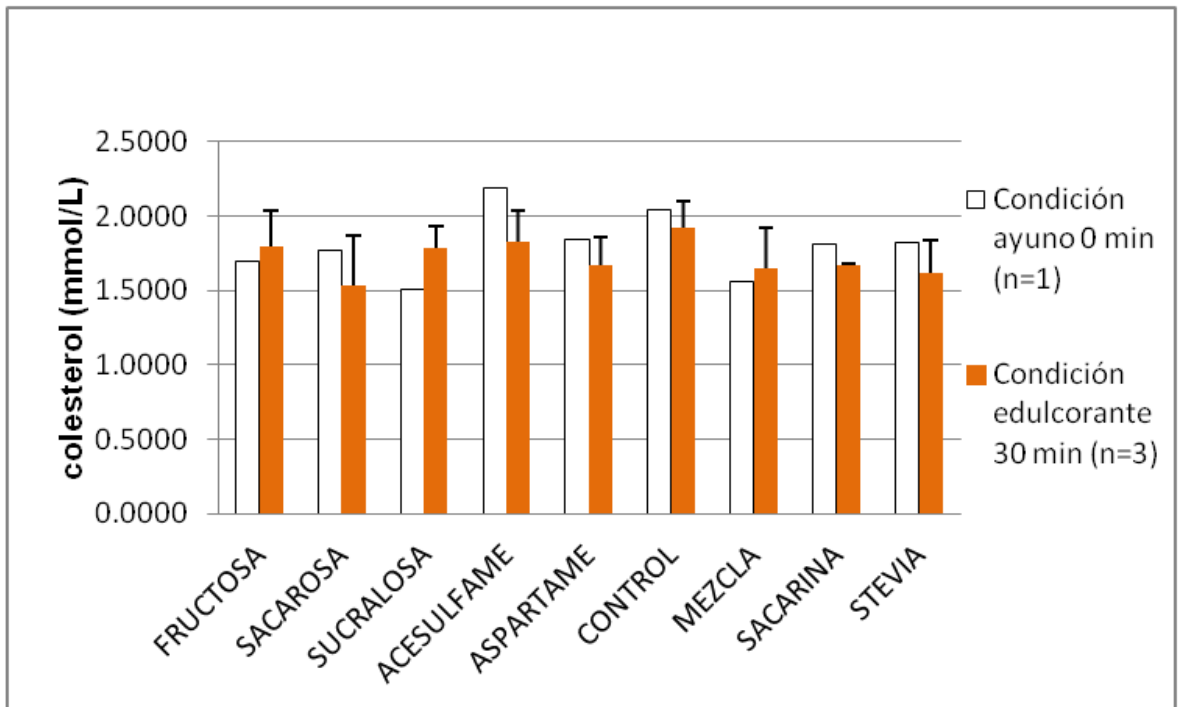


GRÁFICO 4.15. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES AYUNO Y EDULCORANTE

Y, en cuanto a la condición edulcorante, los valores quedaron dentro del mismo rango, o sea que tampoco se observaron amplias variaciones entre los grupos de edulcorantes y el grupo control.

De cualquier forma, se realizó un análisis de varianza para saber si había diferencias significativas entre los grupos de edulcorantes o las condiciones, ayuno y edulcorante. Esto se puede apreciar en la Tabla 4.35, la cual arrojó que no hubieron diferencias estadísticas significativas entre ningún grupo de edulcorantes para la condición edulcorante.

Esto significa que, como se esperaba, no existieron diferencias significativas entre ninguno de los grupos de edulcorantes y el grupo control y, por lo tanto, la administración de ningún edulcorante causó un efecto significativo sobre el parámetro colesterol durante el tiempo del estudio, por lo que será interesante evaluar este parámetro en un estudio de mayor duración de tiempo.

TABLA 4.35. ANÁLISIS DE VARIANZA DE COLESTEROL CONDICIÓN EDULCORANTE CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.36	8	0.04	0.93	0.5132
Intra grupos	0.87	18	0.04		
Total (Corr.)	1.23	26			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

En cuanto a las condiciones de comida y de edulcorante con comida, se reporta el promedio de los cocientes de la concentración de colesterol encontrada para cada condición, entre los gramos de alimento ingeridos por cada rata (Tabla 4.36).

TABLA 4.36. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL POR GRAMO DE ALIMENTO INGERIDO EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA (mmol/Lg)

Condición	Tiempo (min)	Fructosa	Sacarosa	Sucralosa	Acesulfame	Aspartame	Control	Mezcla	Sacarina	Stevia
Comida /g alim. (n= 3)	30	0.463 ±0.04	0.400 ±0.04	0.344 ±0.02	0.848 ±0.03	0.556 ±0.02	0.512 ±0.05	0.362 ±0.05	0.391 ±0.05	0.496 ±0.03
Edul+comida/g alim. (n= 3)	30	0.633 ±0.04	0.475 ±0.03	0.400 ±0.02	0.672 ±0.06	0.390 ±0.06	0.391 ±0.02	0.629 ±0.06	0.644 ±0.04	0.465 ±0.04

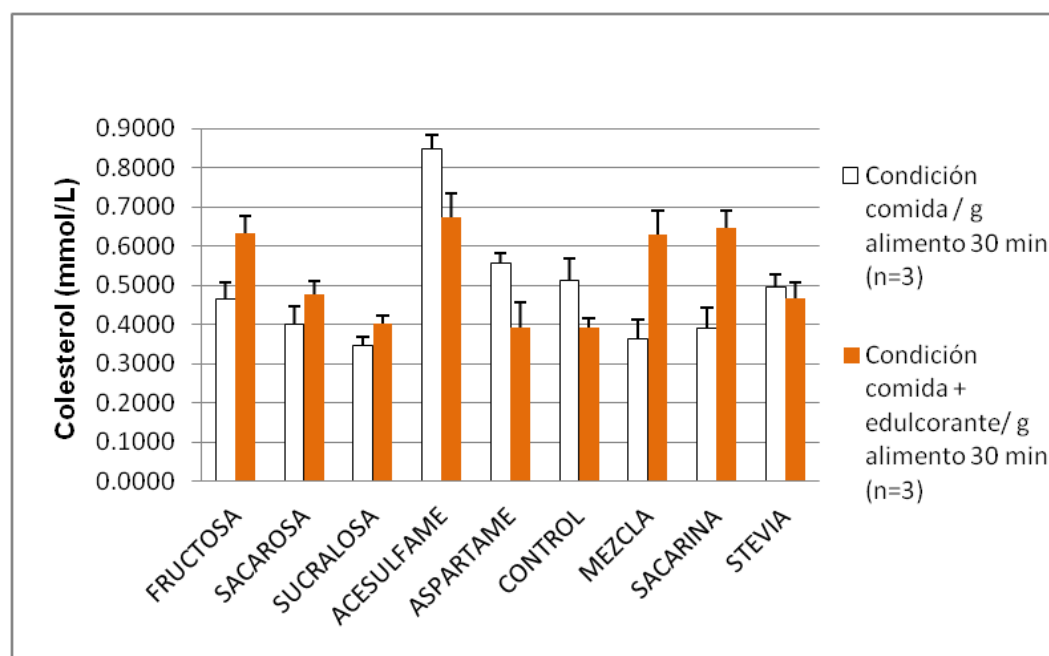


GRÁFICO 4.16. PROMEDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE COLESTEROL POR EDULCORANTE EN LAS CONDICIONES COMIDA Y EDULCORANTE CON COMIDA

De acuerdo con el Gráfico 4.16, se observa claramente que el promedio de colesterol por gramo de alimento ingerido correspondiente al grupo de acesulfame en la condición comida fue significativamente mayor en comparación al grupo control. En cuanto a la condición edulcorante con comida, se observaron a los grupos de fructosa, acesulfame, mezcla y sacarina con una concentración de colesterol por gramo de alimento ingerido evidentemente mayor a la del grupo control.

Se procedió a llevar a cabo el análisis de varianza (ANDEVA) con el objetivo de encontrar posibles diferencias entre las condiciones o entre los grupos de edulcorantes y, como se aprecia en la Tabla 4.37, sólo el valor de P correspondiente al factor edulcorante por gramo de alimento ingerido fue menor a 0.05. Por lo tanto, se podría afirmar que existe una diferencia estadística significativa entre los grupos de edulcorantes sobre la concentración de colesterol con un 95.0% de nivel de confianza para estas 2 condiciones (comida y comida más edulcorante).

TABLA 4.37. ANÁLISIS DE VARIANZA DE COLESTEROL POR GRAMO DE ALIMENTO A DOS FACTORES CON 95.0% DE CONFIANZA

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:Condición	0.01	1	0.01	1.86	0.1800
B:Edulcorante	0.56	8	0.07	7.29	0.0000
RESIDUOS	0.42	44	0.01		
TOTAL (CORREGIDO)	1.00	53			

Nota: Efecto estadísticamente significativo cuando $P < 0.05$

TABLA 4.38. DIFERENCIA MÍNIMA SIGNIFICATIVA (LSD por sus siglas en inglés) DE COLESTEROL POR EDULCORANTE

<i>Contraste</i>	<i>Diferencia significativa</i>	<i>+/- Límites</i>
Acesulfame - Aspartame	0.28	0.11
Acesulfame - Control	0.30	0.11
Acesulfame - Fructosa	0.21	0.11
Acesulfame - Mezcla	0.26	0.11
Acesulfame - Sacarina	0.24	0.11
Acesulfame - Sacarosa	0.32	0.11
Acesulfame - Stevia	0.27	0.11
Acesulfame - Sucralosa	0.38	0.11
Fructosa - Sucralosa	0.17	0.11
Mezcla - Sucralosa	0.12	0.11
Sacarina - Sucralosa	0.14	0.11

Con la finalidad de encontrar los grupos de edulcorantes en los que existió una diferencia significativa, se procedió a realizar la prueba estadística de Diferencia Mínima Significativa (*Least significance difference, LSD* por sus siglas en inglés), la cual se reporta en la Tabla 4.38. Ahí se aprecia que el edulcorante acesulfame presentó una diferencia significativa positiva con respecto al grupo control; sin embargo, la magnitud de dicha diferencia fue de tan sólo 0.3 unidades (mmol/L) por gramo de alimento y podría deberse a la falta de control en la tasa de ingesta de esos gramos de alimento, lo que pudo ocasionar un falso positivo para este grupo.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

De acuerdo con los datos obtenidos de la administración de edulcorantes a corto plazo en ratas Wistar macho, se puede concluir lo siguiente:

- Uno de los objetivos de la presente investigación fue estudiar el comportamiento de la ingesta de las ratas ante las bebidas con edulcorante. Sí se encontraron diferencias significativas y se vió que el grupo de sacarosa fue el grupo que más ingirió bebida con edulcorante, en contraste con el grupo control, el cual fue el que menos bebió agua purificada. Se puede aseverar además que se encontró una tendencia de aumento en la ingesta de las bebidas con edulcorantes por día.
- Otro objetivo fue el de observar el comportamiento de la ingesta de alimento y su posible relación con la ingesta de los edulcorantes. Los grupos en los que se reportó una menor ingesta de alimento fueron los que presentaron una mayor ingesta de bebida, como fueron: mezcla y sacarosa. Y viceversa, aquellos grupos que presentaron una mayor ingesta de alimento, fueron los que ingirieron una menor cantidad de bebida, comportamiento que se observó en los grupos: control y stevia principalmente. Sólo los grupos de fructosa y aspartame fueron la excepción por reportar una baja ingesta de alimento y de bebida.
- En cuanto al análisis de los incrementos de masa de las ratas, a pesar de las diferencias encontradas entre la ingesta de alimento por cada grupo y las diferencias en la toma de bebida con el edulcorante suministrado, no se encontraron diferencias significativas entre los incrementos de masa de las ratas por grupo de edulcorante en este estudio a corto plazo. Sin embargo, se debe tomar en consideración que los días en que esos incrementos fueron positivos (5 días), representaron un lapso muy corto de tiempo para encontrar diferencias significativas en este aspecto, por lo que se recomienda corroborar con un experimento programado a mediano plazo.

Por último, para cumplir con el objetivo de evaluar el efecto metabólico de los edulcorantes se procedió a comparar los resultados obtenidos de las pruebas bioquímicas contra un grupo de ratas control, el cual sólo ingirió agua purificada durante toda la experimentación, buscando diferencias estadísticas significativas, de lo cual se puede concluir lo siguiente:

- Los edulcorantes artificiales sucralosa y mezcla (acesulfame con aspartame) aumentan modesta pero significativamente la secreción de la hormona GIP, esto con respecto al grupo control; mientras que los demás edulcorantes probados no modificaron significativamente las concentraciones de GIP en plasma sanguíneo a los 30 minutos de suministro.
- El hecho de que sucralosa sea un edulcorante que a pesar de no ser absorbido presente la capacidad de unirse a ambas subunidades del receptor del sabor dulce y que probablemente por esta vía estimule la secreción de GIP, lo convierte en un edulcorante no energético pero metabólicamente activo. Aquí resulta interesante mencionar que, en la presente investigación, se probó este edulcorante a una concentración relativamente alta (1mL de sucralosa al 0.18%, aproximadamente 0.1% de masa corporal del roedor) por lo que sería conveniente realizar más experimentos al respecto.
- Empíricamente ni acesulfame de potasio, ni aspartame lograron estimular la liberación de la hormona GIP, pero la mezcla de ambos sí. Esta evidencia apoya la hipótesis de que los receptores del sabor se encuentran íntimamente relacionados con el sistema neuroendocrino intestinal, aunque es claro que aún falta mucho por dilucidar (Fitch y Keim, 2012).
- La presencia de alimento estimula significativamente la secreción de la hormona GIP, de tal manera que no se encontraron diferencias estadísticas entre las condiciones de comida y de comida con edulcorante, es decir, el posible efecto de los edulcorantes en lugar de ser un efecto aditivo al consumo de alimento, más bien se vió opacado por éste en cuanto a la secreción de GIP se refiere.

- Ninguno de los edulcorantes probados lograron modificar significativamente las concentraciones de insulina aún cuando fueron suministrados en alta concentración, tampoco hubo diferencia significativa en aquellos grupos que sí lograron estimular la secreción de GIP (sucralosa y mezcla). De lo anterior se propone que para que exista un efecto sobre la concentración de insulina en sangre debido a la secreción de GIP, se debe rebasar un umbral de concentración de esta última, es decir los edulcorantes energéticos o no energéticos por sí solos no resultaron ser un suficiente estímulo para modificar significativamente la concentración de insulina a los 30 minutos de suministro por lo que será interesante probar un mayor tiempo.
- La concentración de glucosa en el plasma sanguíneo aumentó significativamente al suministrar el edulcorante sacarosa, no obstante, no se obtuvo la misma respuesta con fructosa, lo cual era lo esperado por su bajo índice glicémico. Por tanto, se puede aseverar que ningún edulcorante no energético alteró de manera significativa la concentración basal de glucosa en sangre.
- Los niveles de glucosa aumentaron dependiendo de la cantidad de alimento ingerido, es decir, no se encontró ninguna evidencia en la absorción de glucosa proveniente de la dieta que hubiese sido causada por el suministro de los edulcorantes durante 7 días. Este hallazgo invita a llevar a cabo más estudios *in vivo* en donde se administren edulcorantes naturales y artificiales, para reunir evidencia que ayude a corroborar la hipótesis planteada por varios autores de que una dieta dulce (incluso aquella que incluye edulcorantes no energéticos como sucralosa) podría propiciar una mayor absorción de glucosa por aumento de los transportadores celulares de glucosa SGLT1 (*Sodium-glucose transporter protein*, en inglés) (Margolskee *et al.*, 2007; Mace *et al.*, 2007).
- Tampoco se encontraron diferencias significativas para los parámetros de triglicéridos y colesterol en ninguna condición; sin embargo, sí hubo evidencia de que podría existir alguna relación entre los edulcorantes que fueron capaces de liberar GIP y el

metabolismo de los lípidos. En el presente estudio no puede concluirse al respecto y se recomienda estudiar posteriormente una posible relación entre éstos.

- Finalizando, se cumplieron todos los objetivos planteados, incluso a pesar de no haber reunido la evidencia necesaria, la presente investigación tuvo hallazgos importantes y abre paso a investigaciones posteriores.

5.2 Recomendaciones

Después de llevar a cabo la presente investigación, y para seguir obteniendo información que permita dilucidar un mayor número de incógnitas, así como adquirir conocimiento confiable y veraz, se recomienda:

En todas las investigaciones, probar un grupo que consuma glucosa que, aunque no es muy comúnmente utilizada como edulcorante (con excepción de los caramelos macizos y la cajeta⁴), serviría como comparativo de los resultados obtenidos.

Para medir cualquier parámetro bioquímico, siempre es importante tomar muestras a distintos tiempos para que se pueda observar todo su comportamiento después de un estímulo, así como su pico máximo, lo cual permitirá obtener una mayor información y por lo tanto realizar comparaciones más confiables.

Será conveniente llevar a cabo investigaciones posteriores en donde se mida también la secreción de la hormona GLP-1 tanto en roedores como en humanos, para poder dilucidar alguna relación entre el consumo de edulcorantes naturales o artificiales y alguna alteración en la percepción de saciedad o el apetito.

⁴ En México, se conoce como cajeta a un dulce de leche elaborado con azúcar y leche que, durante varias horas se mantiene en ebullición hasta que adquiere un color café característico de la reacción de Maillard y de caramelización y que se conoce por este nombre porque se guardaba en cajas pequeñas de madera o “cajetas” típicas de la región del centro de México (Celaya, Guanajuato, México). Cuando se usa para formar “sándwiches” con capas muy delgadas de pan se les conoce como obleas. En otros países se le conoce como dulce de leche y a las obleas como “alfajores”

Sería sumamente interesante cuantificar la proteína transportadora SGLT-1, o su ARN mensajero, mientras se suministran edulcorantes calóricos y no calóricos además de realizar una comparación contra un grupo control con el objetivo de corroborar la hipótesis planteada por varios autores de que una dieta dulce (incluso aquella que incluye edulcorantes no energéticos como sucralosa) podría propiciar una mayor absorción de glucosa por aumento de este transportador celular de glucosa, como ya se mencionó.

ANEXO 1

FUNDAMENTO DE LAS DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS

I.- PRINCIPIO Y METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE LA HORMONA GIP (Millipore, 2012).

DESCRIPCIÓN DEL KIT BIOQUÍMICO UTILIZADO

Este kit bioquímico contiene lo siguiente:

- a) MILLIPLEX® MAP Kit (Cat. # RMHMAG-84K) Marca Millipore.
- b) Panel de perlas magnéticas metabólicas para ratas
- c) Placa de 96 pocillos

Principio de la técnica

- MILLIPLEX MAP se basa en la tecnología Luminex ® xMAP ® la cual es una de las tecnologías multiplex de más rápido crecimiento y más respetadas que ofrecen aplicaciones a través de la ciencias de la vida capaces de realizar una serie de bioensayos incluyendo inmunoensayos en la superficie de perlas magnéticas codificadas con fluorescencia conocidas como MagPlex™-C microesferas.
- Luminex ® utiliza técnicas patentadas a nivel interno de microesferas con un código de colores con dos colorantes fluorescentes. A través de conocer concentraciones precisas de estos colorantes es posible crear 100 juegos distintos de microesferas coloreadas, cada uno de los cuales está recubierto con un anticuerpo de captura específico.
- Después de que es capturado un analito de una muestra de ensayo por la perla, se introduce un anticuerpo de detección biotinilado⁵.
- La mezcla de reacción es incubada con un conjugado de Estreptavidina-PE, la cual es la molécula indicadora, con el objetivo de completar la reacción en la superficie de cada microesfera.

⁵ En bioquímica, biotinilación es el proceso de unión covalente de biotina a una proteína, ácido nucleico u otra molécula. La biotinilación es rápido, específico y es poco probable que perturbe la función natural de la molécula debido al pequeño tamaño de la biotina. La biotina se une a la estreptavidina y avidina con una afinidad extremadamente alta, rápido en la tasa-, y alta especificidad, y estas interacciones son explotadas en muchas áreas de la biotecnología para aislar moléculas biotiniladas de interés (WebAcademia, 2013).

- Las microesferas son identificadas por un rayo láser el cual excita los colorantes internos que marcan el conjunto de microesferas. Un segundo láser excita la Estreptavidina-PE, la cual es el colorante fluorescente en la molécula indicadora.
- Finalmente, los procesadores de señal digital de alta velocidad identifican cada microesfera individual y cuantifican los resultados del bioensayo basado en señales indicadoras de manera fluorescentes.

La capacidad de añadir múltiples perlas conjugadas a cada muestra da como resultado la habilidad de obtener múltiples resultados por cada muestra. La tecnología xMAP® de arquitectura abierta permite la multiplexación de muchos tipos de bioensayos que reduce el tiempo, la mano de obra y los costos frente a los métodos tradicionales.

REACTIVOS SUMINISTRADOS

Tabla A.1.1 Contenido del Kit MILLIPLEX

REACTIVO SUMINISTRADO	NÚMERO CATÁLOGO	VOLUMEN	CANTIDAD
Estándar de hormona metabólica de rata	RMH-8084	Liofilizado	1 vial
Controles de calidad 1 y 2 para la hormona metabólica de rata	RMH-6084	Liofilizado	2 viales
Juego de una placa de 96 pocillos con 2 selladores	-----	-----	1 placa 2 selladores
Buffer de ensayo	LE-ABGLP	30 mL	1 botella
Matriz de suero	LRGT-SM	1 mL	1 botella
Diluyente para perlas	LE-BD	3.5 mL	1 botella
Buffer de lavado 10X Nota: Contiene 0.05% del reactivo proclin.	L-WB	30 mL	2 botellas
Anticuerpos de detección para la hormona metabólica de rata	RMH-1084 / RMH-1084-2	5.5 mL	1 botella
Estreptavidina-Ficoeritrina	L-SAPE12	5.5 mL	1 botella

Nota: Almacenar todos los reactivos de 2 a 8°C

Tabla A.1.2 Regiones Luminex® para las perlas magnéticas con anticuerpos inmovilizados para las hormonas metabólicas de rata

Perla/Nombre del Analito	Región para la Perla Magnética Luminex®	13 Analitos Personalizables (Concentración 20X, 200µL) Disponible	
		Cat. #	
Perlas Anti-Péptido 2	12	–	RMCP2-MAG
Perlas Anti-Grelina	20	–	HGRLN-MAG
Perlas Anti-GIP	21	–	HGIP-MAG
Perlas Anti-GLP-1	22	–	HGLP1-MAG
Perlas Anti-Glucagon	33	–	RMGLU-MAG
Perlas Anti-IL-6	35	–	RIL6-MAG
Perlas Anti-Insulina	37	–	RMINS-MAG
Perlas Anti-Leptina	38	–	RMLPTN-MAG
Perlas Anti – MCP-1	56	–	RMMC1-MAG
Perlas Anti-PP	62	–	RMPP-MAG
Perlas Anti-PYY	63	–	RMPYY-MAG
Perlas Anti-TNFα	65	–	RMTNFA-MAG
Perlas Anti-Amilina (activa)	78	–	HAMLNA-MAG

Nota: Las perlas Anti-GIP fueron las únicas utilizadas en el presente experimento.

TOMA DE MUESTRAS Y ALMACENAMIENTO

Preparación de las muestras de plasma sanguíneo

- Al utilizarse las muestras congeladas, se recomienda que se descongelen completamente las muestras, se mezclen bien con la ayuda de un “vortex” y se centrifuguen por 3000 rpm durante 5 min. con la finalidad de eliminar las partículas.

NOTAS:

- Es posible utilizar un máximo de 25µL por pocillo de suero o plasma limpio. El cultivo de tejidos u otros medios también pueden ser utilizados.
- Todas las muestras deberán almacenarse en tubos de polipropileno.
- No guardar las muestras en vidrio.

- Evite desechos, lípidos y células cuando se utilizan muestras con hemólisis total o lipemia.
- Se debe tener cuidado cuando se utiliza la heparina como anticoagulante ya que un exceso de heparina proporcionará valores falsamente altos. No utilice más de 10 μ L de heparina por mL de sangre colectada.

PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA EL INMUNOENSAYO

A. Preparación de las perlas con anticuerpos inmovilizados

Cada vial de perlas con anticuerpos se deberá sonicar durante 30 segundos y agitarse con la ayuda de un “vortex” durante 1 minuto. Transcurrido el tiempo se añaden 150 μ L de cada vial de perlas con anticuerpos a la botella de mezclado del Kit y se lleva a un volumen final de 3.0mL con diluyente para perlas. La porción que no se use deberá almacenarse entre 2-8°C durante un tiempo máximo de un mes.

Ejemplo 1: Cuando se utilicen 13 perlas con anticuerpos inmovilizados, se deberán añadir 150 μ L de cada uno de los 13 viales de perlas a la botella de mezclado y adicionar 1.0mL de Diluyente para perlas.

Ejemplo 2: Cuando se utilicen 9 perlas con anticuerpos inmovilizados, se deberán añadir 150 μ L de cada uno de los 9 viales de perlas a la botella de mezclado y adicionar 1.65mL de diluyente para perlas.

B. Preparación de los controles de calidad

Antes de su uso, reconstituya el frasco indicado como “control de calidad 1” y el de “control de calidad 2” con 250 μ L de agua desionizada. Invierta el frasco varias veces de arriba hacia abajo para mezclar y agitar con la ayuda de un “vortex” durante 15 segundos. Dejar reposar el vial durante 5 a 10 minutos, agitar nuevamente con la ayuda de un “vortex” durante 15 segundos mas y transferir los controles a tubos de polipropileno marca eppendorf debidamente etiquetados. La parte no utilizada puede almacenarse a $\leq -20^{\circ}\text{C}$ hasta por un mes.

C. Preparación de la solución amortiguadora (*buffer* en inglés) de lavado

Llevar el *buffer* de lavado 10X a temperatura ambiente y agitarlo para dejar todas las sales en la solución. Diluir 30mL del *buffer* de lavado 10X con 270mL de agua desionizada. Almacene la porción no utilizada de 2 a 8°C durante máximo un mes.

D. Preparación de la matriz de suero

Nota: Este paso sólo es necesario para muestras de suero o plasma

Se añaden 1.0mL de agua desionizada a la botella marcada como matriz de suero liofilizado. Agitar bien y dejar reposar por lo menos durante 10 minutos para la reconstitución completa. Los restos de la matriz de suero reconstituido pueden almacenarse a ≤ -20 °C hasta por un mes.

E. Preparación del estándar de la hormona metabólica de rata

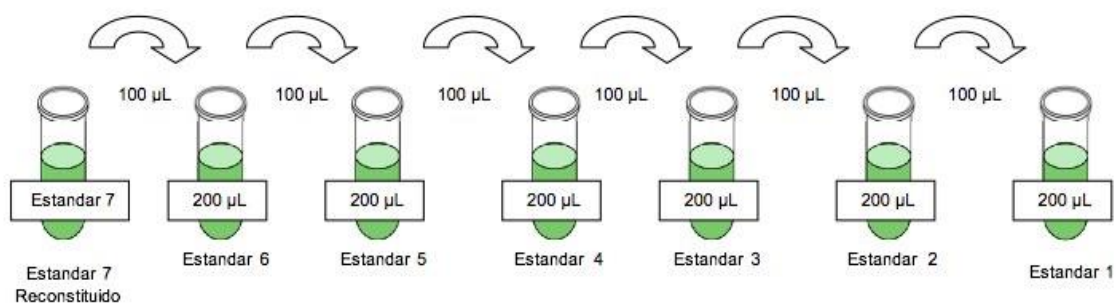
1) Antes de su uso deberá de reconstituirse el estándar de la hormona metabólica de rata con 250µL de agua desionizada. El frasco se invierte varias veces de arriba hacia abajo para mezclarlo agitándose con la ayuda de un “vortex” durante 10 segundos, se deja reposar de 5 a 10 minutos y se agita nuevamente durante 10 segundos más. La solución del estándar se transfiere a tubos de polipropileno microfuga debidamente etiquetados. Éste estándar será utilizado como estándar 7.

PREPARACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE TRABAJO

Para preparar los estándares de trabajo se deberán etiquetar 6 tubos de polipropileno marca eppendorf con las siguientes leyendas: "Estándar 6", "Estándar 5", "Estándar 4", "Estándar 3", "Estándar 2" y "Estándar 1". Se añaden 200µL del *buffer* de ensayo a cada uno de los seis tubos. Se Realizan 3 veces diluciones seriadas mediante la adición de 100µL del "estándar 7" al tubo del "estándar 6", se mezclan bien y se transfieren 100µL del "estándar 6" al tubo del "estándar 5", se mezclan nuevamente y se transfieren 100µL del "estándar 5" al tubo del "estándar 4", se mezclan bien y se transfieren 100µL del "Estándar 4" al tubo del "Estándar 3", se mezclan bien y se transfieren 100µL del "Estándar 3" al tubo del "Estándar 2", se mezclan bien se transfieren 100 µL del "Estándar 2" al tubo del "Estándar 1". El Estándar 0 (blanco) es generalmente el *buffer* de ensayo.

Tabla A.1.3 Volumen de agua desionizada y por añadir a cada estándar

Tubo Estándar	Volumen de agua desionizada a añadir	Volumen de estándar a añadir
Estándar 7	250µL	0
Tubo Estándar	Volumen de <i>buffer</i> de ensayo a añadir	Volumen de estándar a añadir
Estándar 6	200µL	100µL de estándar 7
Estándar 5	200µL	100µL de estándar 6
Estándar 4	200µL	100µL de estándar 5
Estándar 3	200µL	100µL de estándar 4
Estándar 2	200µL	100µL de estándar 3
Estándar 1	200µL	100µL de estándar 2



Después de la serie de diluciones, los tubos deberán tener las siguientes concentraciones finales de la Tabla 1.4 A para la construcción de la curva estándar.

Tabla 1.4.A. Concentración de hormona por tubo estándar

# Tubo Estándar	GIP (pg/mL)
1	2.7
2	8.2
3	25
4	74
5	222
6	667
7	2,000

RECOMENDACIONES

- Antes de comenzar este ensayo, es imprescindible leer completamente este protocolo y comprender a fondo las directrices técnicas.
- Permitir que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiente (20 a 25°C) antes de su uso en el ensayo.
- La colocación de los estándares [0 (blanco), 1, 2, 3,4, 5, 6 y 7], los controles 1 y 2, y las muestras en la placa se hará en una configuración vertical (Nota: La mayoría de los instrumentos sólo leerán la placa de 96 pocillos verticalmente por defecto).
- Si se utiliza una placa de filtro, se deberá colocar la placa de filtro en un soporte de la placa en todo momento durante la dispensación del reactivo y durante las etapas de incubación de modo que la parte inferior de la placa no toque ninguna superficie.

PROCEDIMIENTO DEL INMUNOENSAYO

1. Añadir 200µL de la solución *buffer* de ensayo en cada pocillo de la placa. Sellar y mezclar en un agitador de placas durante 10 minutos a temperatura ambiente (20 a 25°C).
2. Decantar el *buffer* de ensayo y eliminar la cantidad residual de todos los pocillos invirtiendo la placa y golpeándolo con decisión sobre toallas absorbentes varias veces.
3. Añadir 25µL de la solución matriz apropiada a los blancos, los estándares, y los pocillos de control. Cuando se realice el ensayo de suero o plasma, se deberá utilizar la matriz de suero proporcionado en el kit. Cuando se realice el ensayo de cultivo tisular u otro sobrenadante, se deberá utilizar un medio adecuado de cultivo control como la disolución de matriz.
4. Añadir 25µL de *buffer* de ensayo al blanco (0pg/mL de estándar) y a los pocillos de las muestras.
5. Añadir 25µL de cada estándar o control en los pocillos correspondientes.
6. Añadir 25µL de muestra en los pocillos apropiados.
7. Pasar la muestra por un “vortex” a la botella de mezclado y se añaden 25µL a cada pocillo. (Nota: Durante la adición de las perlas se deberá agitar la botella de las perlas intermitentemente para evitar la sedimentación.)
8. Sellar la placa con un sellador de placas que incluye el kit.
- 9.- Envolver la placa con papel aluminio e incubar con agitación constante en un agitador de placas durante toda la noche (18 a 20 horas) a una temperatura de 4°C.

10. Permitir que los reactivos y la placa de ensayo lleguen a temperatura ambiente. Retirar con cuidado el contenido de los pocillos y lavar la placa 3 veces siguiendo las instrucciones que se muestran en la sección abajo descrita de **placa de lavado**.
11. Añadir 50µL de anticuerpos de detección en cada pocillo. (Nota: Permitir que los anticuerpos de detección lleguen a temperatura ambiente antes de la adición).
12. Sellar, cubrir con papel aluminio e incubar con agitación en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25°C).
13. Añadir 50µL de Estreptavidina-Ficoeritrina a cada pocillo que contiene los 50µl de anticuerpos de detección.
14. Sellar, cubrir con papel aluminio e incubar con agitación constante en un agitador de placas durante 30 minutos a temperatura ambiente (20 a 25°C).
15. Retirar con cuidado el contenido de los pocillos y lavar la placa 3 veces siguiendo las instrucciones que se muestran en la sección de **placa de lavado**.
16. Añadir 100µL de la solución de *Sheath Fluid* (o *Drive Fluid* si se utiliza MAGPIX®) incluida en el kit a todos los pocillos para posteriormente resuspender las perlas en un agitador de placas durante 5 minutos.
17. Leer la placa en los siguientes equipos: Luminex 200™, HTS, FLEXMAP 3D™ o MAGPIX® con la ayuda del software xPONENT.
18. Guardar y analizar los datos de intensidad media de fluorescencia (*MFI*, por sus siglas en inglés) utilizando una logística de 5 parámetros o un método de ranuras curvas-ajuste para el cálculo de las concentraciones de analitos en las muestras.

PLACA DE LAVADO

1) Placa sólida

En caso de utilizarse una placa sólida, se deberá utilizar un imán de mano o una lavadora de placa magnética.

A) Para el caso de utilizarse un imán portátil, la placa depositada sobre el imán se debe descansar durante 60 segundos para permitir un asentamiento completo de las perlas magnéticas. Se elimina el contenido de los pocillos decantando suavemente la placa en un recipiente apropiado para desechos y golpeando suavemente sobre almohadillas absorbentes para eliminar el líquido residual. Se lava la placa con 200µL de buffer de lavado removiendo la

placa del imán, añadiendo buffer de lavado y agitando durante 30 segundos se vuelve a colocar sobre el imán, y se dejan asentar las perlas durante 60 segundos más y se remueve el contenido de los pocillos, como se describió anteriormente, después de cada lavado.

B) Para el lavador de las placas magnéticas, dejar que la placa "penetre" en el imán durante 60 segundos para permitir el asentamiento completo de las perlas magnéticas. Se remueve el contenido de los pocillos por aspiración y se lava la placa con 200µL de *buffer* de lavado por pocillo, dejando las perlas "remojarse" durante 60 segundos removiendo el *buffer* de lavado por aspiración después de cada lavado. Se repiten los pasos de lavado como se recomienda en el procedimiento de ensayo. **Nota:** Si se emplea el lavador de placas recomendada para perlas magnéticas (Bio-Tek ELx405) se deberá de seguir la configuración de los equipos apropiados indicados en la sección de **Ajustes de equipo**.

II. PRINCIPIO Y METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE INSULINA (Millipore, 2012).

DESCRIPCIÓN DEL KIT UTILIZADO

RAT INSULIN RIA KIT (Cat. # RI-13K)

PRINCIPIO DEL MÉTODO

En este radioinmunoensayo, una concentración fija de antígeno marcado es incubado con una cantidad de antisuero constante tal que la concentración de uniones entre el antígeno y el anticuerpo son limitadas, por ejemplo, solo el 50% del total de los antígenos marcados se puede unir al anticuerpo. Si antígeno no marcado se añade al sistema, existe una competencia entre el antígeno marcado y el antígeno no marcado, por los limitados y constantes sitios de unión en el anticuerpo. Por lo tanto la cantidad de marcador unido al anticuerpo disminuye a medida que aumenta la concentración de antígeno sin marcar. Este se puede medir después de separar el anticuerpo unido del marcador libre y contando una o la otra, o ambas fracciones. La curva estándar se elabora con concentraciones crecientes de antígeno estándar no marcado y a partir de esta curva la cantidad de antígeno en las muestras puede ser calculada. Así las cuatro necesidades básicas para un radioinmunoensayo son: un antisuero específico para el antígeno a ser medido, la disponibilidad de una forma radioactiva del antígeno marcado, un método por el cual se pueda separar el anticuerpo unido al marcador y el marcador libre y finalmente un instrumento para cuantificar la radioactividad. El radioinmunoensayo para insulina de rata de Millipore® utiliza insulina marcada con I^{125} y antisuero para insulina de rata para determinar el nivel de insulina en suero, plasma tejidos o medios de cultivo por la técnica de dobleanticuerpo/PEG.

REACTIVOS

A. *Buffer* de ensayo:

0.05M fosfatos, pH=7.4, contiene 0.025M EDTA, 0.08% de azida de sodio y 1% BSA grado RIA.

B. Anticuerpo para insulina de rata:

Antisuero de cobayo para insulina de rata en *buffer* de ensayo.

C. I^{125} :

Insulina marcada con I^{125} , purificada grado cromatográfico (*HPLC*, por sus siglas en inglés) (con una actividad específica 367 μ Ci/ μ g). Liofilizado para su estabilidad.

D. Buffer de hidratación del marcador:

Buffer de ensayo que contiene IgG de cobayo como portador. Usar todo el contenido para hidratar la insulina marcada con I¹²⁵.

E. Estándares de insulina de rata:

Insulina de rata purificada en *buffer* de insulina de rata en la concentración de 10.0ng/mL

F. Control de calidad 1 & 2:

Insulina de rata purificada en *buffer* de ensayo.

G. Reactivo precipitante:

Suero de cabra anti- IgG de cobayo, 3% PEG y 0.05% de Triton X-100 en 0.05M de *buffer* de fosfatos, 0.025M EDTA, 0.08% de azida de sodio.

TOMA DE MUESTRA Y ALMACENAMIENTO

1. Hasta un máximo de 100µL de suero por cada tubo del ensayo puede ser usado, sin embargo 50µL es adecuado para cada tubo en ciertas aplicaciones como cultivos de tejido y otros medio pueden ser utilizados.
2. Ser cuidadoso cuando se tomen las muestras con heparina como anticoagulante, ya que un exceso puede dar falsos valores elevados. No usar más de 10 UI de heparina por mL de sangre colectada.
3. Las muestras pueden ser almacenadas a 4°C cuando el ensayo se realizara dentro de las 24 horas posteriores a la recolección. Para un almacenamiento prolongado, las muestras se deben almacenar a menos de -20°C. Evitar múltiples ciclos de congelación.
4. Evitar usar muestras con una gran hemolisis lipemia.

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

1) Preparación del estándar

Cuidadosamente abrir el vial del estándar.

Marcar 6 tubos 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Añadir 1.0mL de *buffer* de ensayo a cada uno de los 6 tubos. Preparar diluciones seriadas por la adición de 1.0mL del estándar de 10ng/mL al tubo 1, mezclar bien y transferir 1mL del tubo 1 al tubo 2, mezclar bien y transferir 1mL del tubo 2 al

tubo 3, mezclar bien y transferir 1mL del tubo 3 al tubo 4, mezclar bien y transferir 1mL del tubo 4 al tubo 5, mezclar bien y transferir 1mL del tubo 5 al tubo 6, mezclar bien.

Tabla A.2.1. Volúmenes a añadir y concentración de la curva estándar

Tubo #	Concentración de estándar	Volumen de buffer de ensayo a añadir	Volumen de estándar a añadir
1	1.0mL de 5 ng/mL	1.0mL	1.0mL de 10 ng/mL
2	1.0mL de 2.5 ng/mL	1.0mL	1.0mL de 5 ng/mL
3	1.0mL de 1.25 ng/mL	1.0mL	1.0mL de 2.5 ng/mL
4	1.0mL de 0.625 ng/mL	1.0mL	1.0mL de 1.25 ng/mL
5	1.0mL de 0.313 ng/mL	1.0mL	1.0mL de 0.625 ng/mL
6	1.0mL de 0.156 ng/mL	1.0mL	1.0mL de 0.313 ng/mL

Se recomienda no usar pipeta repetidora y cambiar la punta por cada dilución.

Día uno del ensayo

1. Pipetear 200µL de buffer de ensayo a los tubos de enlace no específico (NBS) (tubos 3 y 4) y 100µL a la referencia (tubos 5 y 6). No se añade buffer a partir del tubo 7 y hasta el final del ensayo.
2. Pipetear 100µL de estándar y controles de calidad, por duplicado (ver Tabla 1.A)
3. Pipetear 100µL de cada muestra por duplicado. (NOTA: Pequeños volúmenes de muestra pueden ser usados cuando se sabe de antemano que la concentración de insulina será alta o cuando la cantidad de muestra es limitada. Buffer de ensayo deberá ser añadido hasta alcanzar el volumen de los 100µL.)
4. Pipetear 100µL de ¹²⁵I –Insulina hidratada a todos los tubos. (Nota consultar metodología anexa para la hidratación)
5. Pipetear 100µL de anticuerpo de insulina de rata a todos los tubos excepto a los tubos de cuenta total (1 y 2) y a los tubos del Buró Nacional de Estándares (NBS, por sus siglas en inglés) (tubos 3 y 4).
6. Agitar en un “vortex”, cubrir e incubar durante una noche (20 a 24 horas) a 4°C.

Día dos del ensayo

7. Añadir 1.0mL del agente precipitante frío (4°C) a todos los tubos excepto a los tubos de cuenta total (1 y 2).
8. Agitar en un “vortex” e incubar 20 minutos a 4°C.

9. Centrifugar a 4°C, todos los tubos excepto los tubos de cuenta total (1 y 2) por 20 minutos a 2,000-3,000xg. NOTA: Si es inferior a 2000xg o se observan pellets divididos, el tiempo de centrifugación debe ser aumentado hasta lograra obtener un pellet firme.

Conversión de rpm a xg:

$$xg=(1.12 \times 10^{-5})(r) (\text{rpm})^2$$

r=distancia radial en cm (desde el eje de rotación hasta el fondo del tubo)

rpm=revoluciones por minuto.

10. Inmediatamente decantar todo el sobrenadante de todos los tubos excepto a los tubos de cuenta total (1-2). Escurrir los tubos por al menos 15 a 60 segundos (ser consistente entre cada muestra). secar el exceso de líquido del borde de los tubos. NOTA: invertir los tubos solo una vez. Los pellets son frágiles y pueden desprenderse.

11. Medir todos los tubos en un contador de rayos gamma por 1 minuto. Calcular los ng/mL de la insulina de rata de las muestras usando el procedimiento automatizado de tratamiento de datos.

El contenido esta liofilizado, hidratar con el contenido completo del buffer de hidratación. Dejar reposar a temperatura ambiente por 30 minutos, con agitación suave ocasionalmente.

CÁLCULOS Y TRANSFORMACIONES

A. EXPLICACIÓN

Los cálculos para la insulina de rata pueden ser automáticamente realizados por muchos de los contadores de rayos gamma que cuentan con la capacidad de analizar los datos o por el tratamiento independiente de los datos usando algún software comercial especial para dicho propósito.

NOTA: Asegurarse que el procedimiento usado resta el recuento de NBS a cada promedio, excepto a os recuentos totales, antes de la reducción final de los datos para su análisis.

B. CÁLCULO MANUAL

1. Promediar los duplicados de los tubos de cuenta total (1-2), los *NBS*⁶ (3-4), los tubos de enlace (5-6) y los duplicados de los estándares y muestras.
2. Restar el valor en el recuento de *NBS*⁶ para cada valor (excepto los de la cuenta total). Estos valores son usados en los subsecuentes cálculos.
3. Calcular el porcentaje de marcador unido

$$\left[\frac{\text{Cuenta de los tubos de enlace}}{\text{Cuenta total}} \right] \times 100$$

4. Calcular el porcentaje del total de uniones (%B/Bo) para cada estándar y la muestra

$$\%B/Bo = \frac{\text{Muestra o estandar}}{\text{Total de enlaces}} \times 100$$

5. Graficar el %B/Bo para cada estándar sobre el eje "Y" y la concentración conocida de los estándares en el eje X usando un papel log-log.
6. Construir la curva patrón uniendo los puntos con una curva suave.
7. Determinar los ng/mL de la insulina de rata de las muestras y los controles por interpolación en la curva patrón.

NOTA: Cuando los volúmenes de muestra fueron diferentes a los 100µL, se debe hacer un ajuste matemático apropiado para corregir de acuerdo con el factor de dilución. (Por ejemplo si solamente se usaron 50µL, los resultados deben multiplicarse por el factor de 2).

8. Para convertir los valores de insulina de rata de ng/mL a pmol, multiplicar los ng/mL por 175.

INTERPRETACIÓN

Criterio de aceptación

1. La corrida se considera aceptable cuando todos los valores de los controles de calidad caen dentro del rango teórico del control de calidad y, si ninguno de los controles de calidad cae fuera de este rango, proseguir con el procesamiento de los datos.
2. Si la diferencia entre los resultados de cada duplicado es mayor a 10% CV, repetir la muestra.

⁶ Siglas en inglés de Buró Nacional de estándares, se refiere a tubos que han sido certificados por esta institución.

3. El límite de sensibilidad para el ensayo de insulina de rata es de 0.081ng/mL+ 2SD(para muestras de 100µL)
4. El límite de linealidad del método es de 10ng/mL(para muestras de 100µL). Ningún resultado mayor a 10ng/mL deberá ser tomado en cuenta ni repetido, ni realizando dilución con buffer de ensayo.

RANGO NORMAL

0.5ng/mL

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

A. Sensibilidad:

La menor nivel de insulina de rata detectable es de 0.081ng/mL+2SD cuando se usan muestras de100µL.

B. Rendimiento

Los siguientes parámetros del método son expresados como valor±desviación estándar.

ED₈₀= 0.26 ± 0.05ng/mL

ED₅₀= 1.1 ±0.15ng/mL

ED₂₀= 5.0± 0.70ng/mL

C. Especificidad

La especificidad (también conocida como selectividad) de un test analítico es su capacidad para medir selectivamente el analito en la presencia de otros presentes en la misma matriz.

- | | |
|-----------------------|------|
| • Insulina de rata I | 100% |
| • Insulina de rata II | 100% |
| • Insulina humana | 100% |
| • Proinsulina humana | 69% |

Tabla A.2.2. Procedimiento del ensayo resumido en pasos

Día uno						Día dos		
	Paso 1	Pasos 2 a 3	Paso 4	Paso 5	Paso 6	Paso 7	Paso 8	Pasos 9 a 11
Numero de tubo	Añadir buffer de ensayo	Añadir estándar/QC/Muestras	Añadir Insulina marcada con ¹²⁵ I	Añadir anticuerpos para insulina de rata.	Agitar en “vortex”, Cubrir e incubar 20 a 24 horas a 4°C	Añadir agente precipit ante	Agitar en “vortex” e incubar 20 minutos a 4°C.	Centrifugar a 2,000 a 3,000xg a 4 °C por 20 minutos, decantar y medir.
1,2	-	-	100µL	-				
3,4	200µL	-	100µL	-				
5,6	100µL	-	100µL	100µL				
7,8	-	100µL de 0.156ng/mL	100µL	100µL				
9,10	-	100µL de 0.313ng/mL	100µL	100µL				
11,12	-	100µL de 0.625ng/mL	100µL	100µL				
13,14	-	100µL de 1.25ng/mL	100µL	100µL				
15,16	-	100µL de 2.5ng/mL	100µL	100µL				
17,18	-	100µL de 5.0ng/mL	100µL	100µL				
19,20	-	100µL de 10.0ng/mL	100µL	100µL				
21,22	-	100µL de QC 1	100µL	100µL				
23,24	-	100µL de QC 2	100µL	100µL				
25,26	-	100µL de muestra	100µL	100µL				
27,n	-	100µL de muestra	100µL	100µL				

III. PRINCIPIO DE LA DETERMINACIÓN DE GLUCOSA (YSI, 2013).

DESCRIPCIÓN DEL INSTRUMENTO:

YSI 2700 SELECT, Biochemistry Analyser

CONFIGURACIÓN QUÍMICA

El YSI 2700 SELECT ha sido diseñado para proporcionar flexibilidad considerable con respecto a la forma en que se puede configurar. Esto le permite utilizar el instrumento para otros análisis además de las configuraciones estándar. Esta flexibilidad también hace que sea posible para YSI desarrollar e introducir nuevos análisis químicos en el futuro sin cambios importantes en el instrumento.

Se analizará brevemente el principio de utilizar enzimas oxidasas inmovilizadas.

PRINCIPIO

La tecnología de sensores enzima YSI emplea una o más reacciones catalizadas por enzimas para producir finalmente peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es electroquímicamente oxidado en el ánodo de platino de una sonda electroquímica. Esto produce una corriente de señal de la sonda.

En muchos procedimientos que utilizan enzimas, la enzima es desechada con la muestra después de que el análisis se realiza. La tecnología de YSI permite la conservación de la enzima inmovilizándola en una estructura de membrana patentada.

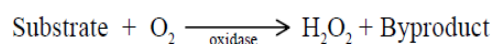
La membrana enzimática se acopla con una sonda electroquímica y se aloja en una cámara de la muestra, donde se producen la entrega de la muestra y el lavado. La vida de la membrana enzimática se mide en días o semanas, y no depende del número de muestras analizadas. Si se usa con frecuencia, puede medir centenares de muestras con una sola membrana enzimática antes de que su función se vea comprometida.

En enzimología, los términos sustrato y producto se utilizan comúnmente para describir una reacción. Una enzima es una molécula de proteína con gran especificidad que cataliza la conversión de uno o más sustratos para dar uno o más productos. En la tecnología de YSI, el producto de una reacción de oxidasas es siempre el peróxido de hidrógeno. El peróxido de

hidrógeno se requiere para producir una señal significativa de corriente en la sonda electroquímica.

Un sustrato, como dextrosa, entra en la cámara de muestra y se agita y se diluye. El sustrato se difunde entonces a través de un material de membrana delgada de policarbonato. La velocidad de la reacción química que se muestra a continuación se limita principalmente por difusión. Esto da lugar a linealidad mejorada, estabilidad de la calibración y la ausencia de errores por inhibición enzimática.

Una vez pasada la membrana de policarbonato, el sustrato se encuentra con una capa extremadamente delgada de la enzima oxidasa apropiada. Ahí ocurre la siguiente reacción:



Aunque el oxígeno es consumido en esta reacción, el buffer no se agota seriamente de oxígeno, ni la tasa de reacción de la enzima es muy sensible a pequeños cambios en la concentración de oxígeno. Por lo tanto, no es necesario medir o controlar el contenido de oxígeno en la cámara de la muestra.

El peróxido de hidrógeno se difunde hacia el ánodo de platino en el conjunto de sonda. Esto da lugar a la corriente de señal de la sonda.

El ánodo de platino está protegido de otras sustancias oxidables por una capa delgada de acetato de celulosa. Esto hace que el ánodo sea específico para el peróxido de hidrógeno. De bajo masa molecular, los compuestos reductores pueden interferir. Interferencias típicas incluyen fenoles, hidrazina, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Una variedad de tipos de muestras pueden ser analizadas con el SELECT 2700. Generalmente, la única preparación de la muestra que puede ser necesaria es la dilución de la muestra, para llevar la concentración del sustrato dentro del rango lineal del instrumento.

Ni el color ni la turbidez interfiere con las mediciones.

Las partículas pequeñas no afectan a la reacción en la cámara de muestra que alberga las sondas, pero las muestras con partículas suficientemente grandes para obstruir la bombilla deben ser evitadas.

PRINCIPIOS DE OPERACIÓN

Tecnología del Sensor

La tecnología del sensor del YSI 2700 SELECT esta basada sobre los principios concebidos por el Dr. Leland Clark del Children's Hospital Foundation, Cincinnati, Ohio. La membrana con enzimas inmovilizadas fue inventada por YSI y esta cubierta por la patente U.S. 4,073,713. La tecnología de este sensor ha sido utilizada exitosamente desde 1975 en el YSI 23A Blood Lactate Analyser; entonces más tarde en el YSI 27 Industrial Analyser y el YSI 23L Blood Lactate Analyser. Más recientemente, la misma tecnología ha sido empleada en el YSI 2300 STAT PLUS Glucose and L-Lactate Analyser y el YSI 1500 SPORT Lactate Analyser.

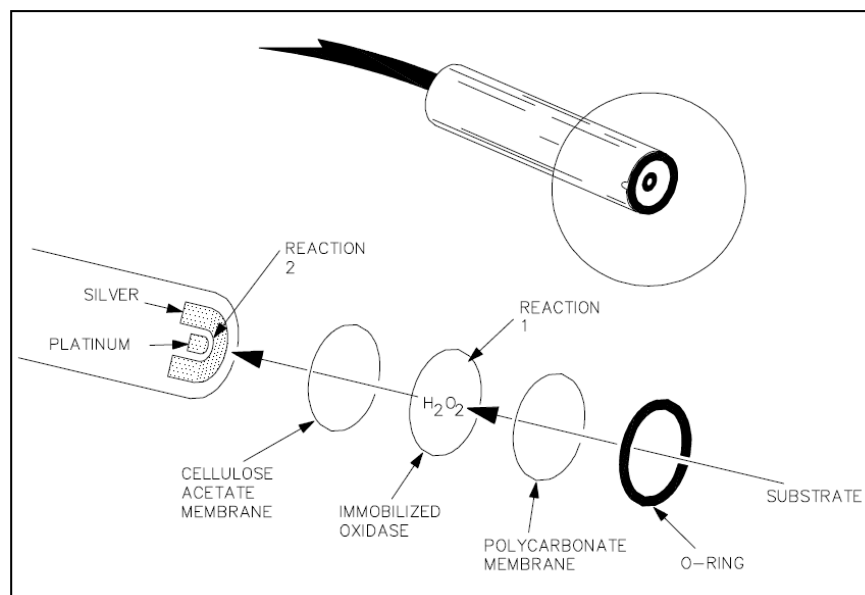


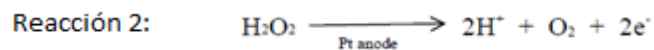
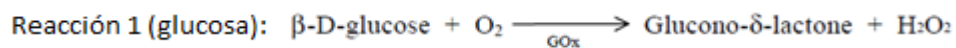
Figura A.3.1. Sensor de la Sonda y Membrana Enzimática (YSI, 2013).

Cada sonda esta equipada con una membrana de tres capas que contienen enzimas inmovilizadas en la capa media. En la Figura 3.1.A se muestra una vista de las partes de la membrana y su relación con la cara de la sonda.

La cara de la sonda, cubierta por la membrana, esta situada en una cámara para muestras llena de buffer dentro de la cual una muestra es inyectada. Algunos de los sustratos difunden a través de la membrana. Cuando se pone en contacto con la enzima oxidasa inmovilizada, es oxidada rápidamente, produciendo peróxido de hidrógeno. Véase la Reacción 1, usando glucosa como un ejemplo.

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es, a su vez, oxidado en el ánodo de platino, produciendo electrones (Reacción 2). Un equilibrio dinámico es alcanzado cuando el ritmo de producción de

H₂O₂ y el ritmo en el que el H₂O₂ deja la capa de enzimas inmovilizadas son constantes y es indicado por un estado de respuesta estable.



El electrodo de platino se mantiene en un potencial anódico y es capaz de oxidar muchas sustancias distintas al H₂O₂. Para evitar que estos agentes reductores contribuyan al sensor de corriente, la membrana contiene una capa interna que consiste en una película muy fina de acetato de celulosa. Esta película deja pasar fácilmente H₂O₂ pero excluye compuestos químicos con masas moleculares superiores a aproximadamente 200.

La película de acetato de celulosa también protege la superficie de platino de proteínas, detergentes y otras sustancias que podrían ensuciar. Sin embargo, la película de acetato de celulosa puede ser penetrada por compuestos tales como sulfuro de hidrógeno, mercaptanos de baja masa molecular, hidroxilaminas, hidrazinas, fenoles y anilinas.

IV. PRINCIPIO Y METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE TRIGLICÉRIDOS Y COLESTEROL

DESCRIPCIÓN DEL KIT UTILIZADO

Triglicéridos FS*

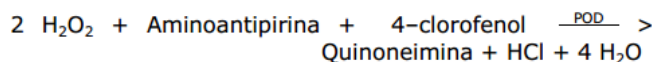
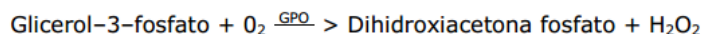
Reactivo de diagnóstico para la determinación cuantitativa *In Vitro* de triglicéridos en suero o plasma en equipos fotométricos

MÉTODO

Test colorimétrico enzimático utilizando glicerol-3- fosfato-oxidasa (*GPO*, por sus siglas en inglés)

PRINCIPIO

Determinación de los triglicéridos después de la división enzimática con lipasa lipoproteína. El indicador es la quinoneimina la cual se genera a partir de la 4-aminoantipirina y el 4-clorofenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa.



TIPO DE MUESTRA

Suero, plasma con heparina o con EDTA

Estabilidad: 2 días de 20 a 25°C

7 días de 4 a 8°C

Por lo menos un año a -20°C

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Longitud de onda 500nm, Hg 546nm

Paso óptico 1cm

Temperatura De 20 a 25°C / 37°C

REACTIVOS

Tabla A.4.1. Componentes y Concentraciones

Componente	Concentración
Solución amortiguadora pH 7.2	50mmol/L
4-Clorofenol	4mmol/L
ATP	2mmol/L
Mg ²⁺	15mmol/L
Glicerokinasa (GK)	≥0.4kU/L
Peroxidasa (POD)	≥2kU/L
Lipasa lipoproteína (LPL)	≥2kU/L
4-Aminoantipirina	0.5mmol/L
Glicerol-3-fosfato-oxidasa (GPO)	≥0.5kU/L
Estándar:	200mg/dL (2.3mmol/L)

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

El reactivo y el estándar están listos para ser usados.

Tabla A.4.2. Método de medida respecto a un blanco de reactivo

	Blanco	Muestra/Estándar
Muestra/Estándar	-	10μL
Agua destilada	10μL	-
Reactivo	1000μL	1000μL

Mezclar, incubar durante 20 minutos a 20 a 25°C o durante 10 minutos a 37°C. Leer la absorbancia dentro de 60 minutos contra el blanco.

CÁLCULO

Con estándar o calibrador:

$$\text{Trigliceridos [mg / dL]} = \frac{\Delta A \text{ Muestra}}{\Delta A \text{ Estd. / Cal}} \times \text{Conc. Estd. [mg / dL]}$$

Para corregir el glicerol libre, restar 10mg/dL (0.11mmol/L) del valor de los triglicéridos calculado más arriba.

Factor de conversión

Triglicéridos [mg/dL] x 0.01126 = Triglicéridos [mmol/L]

DESCRIPCIÓN DEL KIT UTILIZADO

Colesterol FS*

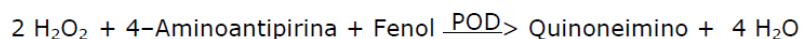
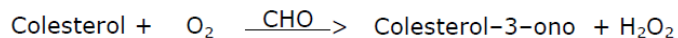
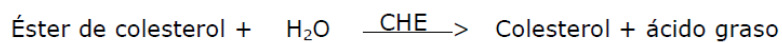
Reactivo para la determinación cuantitativa *In Vitro* de colesterol en suero o plasma en equipos fotométricos

MÉTODO

Prueba enzimática fotométrica “CHOD-PAP”

PRINCIPIO

Determinación del colesterol después de la hidrólisis enzimática y la oxidación. El indicador colorimétrico es el quinoneimino que se genera de 4-aminoantipirina y fenol por el peróxido de hidrógeno bajo la acción catalítica de la peroxidasa (Reacción de Trinder).



REACTIVOS

Tabla A.4.3. Componentes y Concentraciones

Reactivo	Concentración
Solución amortiguadora pH=6.7	50mmol/L
Fenol	5mmol/L
4-Aminoantipirina	0.3mmol/L
Colesterol Esterasa (CHE)	≥200U/L
Colesterol Oxidasa	≥50U/L
Peroxidasa	≥3kU/L
Estándar:	200mg/dL (5.2mmol/L)

PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

El reactivo y el estándar están listos para ser usados.

MATERIALES REQUERIDOS PERO NO INCLUIDOS EN EL KIT SINO QUE DEBEN ESTAR EN EL LABORATORIO DE PRUEBA

- Solución de NaCl 9g/L
- Equipo general de laboratorio

TIPO DE MUESTRA

Suero, plasma heparinizado o con EDTA

Estabilidad:

7 días de 20 a 25°C

7 días de 4 a 8°C

3 meses de -20°C

PROCEDIMIENTO DEL ENSAYO

Longitud de onda	500nm, Hg 546nm
Paso óptico	1cm
Temperatura	entre 20 y 25°C/37°C
Medición	Respecto blanco de reactivo

Tabla A.4.4. Método de medida respecto a un blanco de reactivo

	Blanco	Muestra/Estándar
Muestra/Estándar	-	10µL
Agua destilada	10µL	-
Reactivo	1000µL	1000µL

*Mezclar, incubar durante 20 min. a 20 a 25°C o durante 10min. a 37°C. Leer la absorbancia dentro de 60min. contra el blanco.

CÁLCULO

Con estándar o calibrador

$$\text{Colesterol [mg / dL]} = \frac{\Delta A \text{ Muestra}}{\Delta A \text{ Estd. / Cal}} \times \text{Conc. Estd. / Cal [mg / dL]}$$

FACTOR DE CONVERSIÓN

$$\text{Colesterol [mg/dL]} \times 0,02586 = \text{Colesterol [mmol/L]}$$

ANEXO 2

DATOS DE CADA ESPÉCIMEN POR DÍA DE SU MASA Y DEL ALIMENTO Y BEBIDA INGERIDOS

A) GRUPO DE FRUCTOSA

RATA 27	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	146.9	142.1	136.9	142.4	142.5	144	147.9	151.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-4.8	-5.2	5.5	0.1	1.5	3.9	3.9
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.4	15	10.2	8.2	9.1	5.7	7.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.6	5	9.8	11.8	10.9	14.3	12.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	92	88	70	86	81	65	57	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	8	12	30	14	19	35	43	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	8	20	50	64	83	118	161	-

RATA 10	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	135.1	127.8	122.5	129.4	129.1	133.1	137.8	142.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-7.3	-5.3	6.9	-0.3	4	4.7	4.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.6	15	11.4	9.4	7.5	5.8	6.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.4	5	8.6	10.6	12.5	14.2	13.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	100	62	80	71	70	77	61	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	0	38	20	29	30	23	39	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	0	38	58	87	117	140	179	-

RATA 21	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	138.1	135.3	131.2	136.5	135.9	137.4	142	146.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-2.8	-4.1	5.3	-0.6	1.5	4.6	4.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	13.8	11.5	9.5	8.9	8.4	3	5.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6.2	8.5	10.5	11.1	11.6	17	14.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	89	85	62	61	91	70	72	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	11	15	38	39	9	30	28	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	11	26	64	103	112	142	170	-

RATA 7	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	141	135.5	130.1	133.3	132.8	138.3	140.9	143.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-5.5	-5.4	3.2	-0.5	5.5	2.6	2.5
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.2	13.5	9.5	11.3	7	5	6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.8	6.5	10.5	8.7	13	15	14	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	95	82	72	75	79	80	64	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	5	18	28	25	21	20	36	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	5	23	51	76	97	117	153	-

RATA 3	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	138.7	129	124.4	129	133.2	136.1	141.4	146.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-9.7	-4.6	4.6	4.2	2.9	5.3	5.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.8	14.9	8.4	7.7	7.1	3.5	5.3	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.2	5.1	11.6	12.3	12.9	16.5	14.7	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	97	92	87	73	77	79	67	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	3	8	13	27	23	21	33	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	3	11	24	51	74	95	128	-

RATA 17	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	150.1	140.4	137.8	145.9	147.1	149.9	156	162.1
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-9.7	-2.6	8.1	1.2	2.8	6.1	6.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16	13.1	1.5	4.4	4.3	2.9	3.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4	6.9	18.5	15.6	15.7	17.1	16.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	100	84	69	62	64	73	55	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	0	16	31	38	36	27	45	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	0	16	47	85	121	148	193	-

RATA 23	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	141.6	133.8	131	137.9	137.4	140.6	146	151.3
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-7.8	-2.8	6.9	-0.5	3.2	5.4	5.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.5	15.7	9.2	9.4	9.8	2.3	6.1	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.5	4.3	10.8	10.6	10.2	17.7	13.9	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	98	82	72	71	87	83	82	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	2	18	28	29	13	17	18	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	2	20	48	77	90	107	125	-

RATA 20	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	135.3	134.2	127	131	132.2	138.1	144.4	150.7
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-1.1	-7.2	4	1.2	5.9	6.3	6.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	12.6	13.1	8	8	7.7	5.4	6.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	7.4	6.9	12	12	12.3	14.6	13.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	95	64	57	78	61	73	71	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	5	36	43	22	39	27	29	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	5	41	84	106	145	172	201	-

RATA 1	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	135.6	130.3	127.3	130.7	131.5	134.2	139.6	144.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-5.3	-3	3.4	0.8	2.7	5.4	5.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14	12.3	7.9	8.5	8.8	5	6.9	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6	7.7	12.1	11.5	11.2	15	13.1	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	99	92	84	72	78	76	59	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	1	8	16	28	22	24	41	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	1	9	25	53	75	99	140	-

RATA 13	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	146.2	139.9	136.7	140.6	143.4	146.2	151.3	156.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-6.3	-3.2	3.9	2.8	2.8	5.1	5.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.4	13.9	7.1	8.9	7.5	4.8	6.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.6	6.1	12.9	11.1	12.5	15.2	13.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	93	85	79	73	85	78	68	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	7	15	21	27	15	22	32	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	7	22	43	70	85	107	139	-

B) GRUPO DE SACAROSA

RATA 11	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	138.7	125.6	126.9	126	126.2	129.8	133.3	140.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.1	1.3	-0.9	0.2	3.6	3.5	6.9
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.3	11	13.8	10.7	6.3	7.4	8.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.7	9	6.2	9.3	13.7	12.6	11.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	86	74	64	55	68	67	69	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	14	26	36	45	32	33	31	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	14	40	76	121	153	186	217	-

RATA 25	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	143.2	132	133.9	135.4	134.1	137.7	141.2	148.3
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-11.2	1.9	1.5	-1.3	3.6	3.5	7.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.8	9.2	9.2	9	8.3	6.5	4.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.2	10.8	10.8	11	11.7	13.5	15.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	52	76	66	75	95	58	74	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	48	24	34	25	5	42	26	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	48	72	106	131	136	178	204	-

RATA 9	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	148.9	132.5	133.6	136.3	136.3	137.5	138.6	145.3
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-16.4	1.1	2.7	0	1.2	1.1	6.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.8	10.4	7.3	11.8	10.5	9.2	7.9	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.2	9.6	12.7	8.2	9.5	10.8	12.1	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	73	74	63	74	60	71	67	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	27	26	37	26	40	29	33	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	27	53	90	116	156	185	218	-

RATA 2	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	137.9	136.7	138.9	139	140.5	145.1	149.7	156.1
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-1.2	2.2	0.1	1.5	4.6	4.6	6.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	13.8	8.3	9.3	9.3	5	5.5	5.9	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6.2	11.7	10.7	10.7	15	14.5	14.1	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	76	72	69	68	82	61	73	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	24	28	31	32	18	39	27	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	24	52	83	115	133	172	199	-

RATA 14	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	138.7	136.1	140.1	140	142.2	147	151.8	160
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-2.6	4	-0.1	2.2	4.8	4.8	8.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.1	10.6	8.9	9.5	7.5	5.9	5.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.9	9.4	11.1	10.5	20	20	14.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	73	76	65	81	77	81	53	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	27	24	35	19	23	19	47	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	27	51	86	105	128	147	194	-

RATA 29	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	149.2	143.1	146.8	148	151	158.8	166.6	171.7
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-6.1	3.7	1.2	3	7.8	7.8	5.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.7	9.9	9.8	8.6	4.5	5.4	6.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.3	10.1	10.2	11.4	15.5	14.6	13.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	62	82	52	63	62	75	80	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	38	18	48	37	38	25	20	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	38	56	104	141	179	204	224	-

RATA 5	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	164.2	142.1	145	143.2	146.1	151.1	156	161.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-22.1	2.9	-1.8	2.9	5	4.9	5.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	19.8	9.8	8.7	7.8	5.1	6.7	8.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	0.2	10.2	11.3	12.2	14.9	13.3	11.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	84	70	53	68	63	79	76	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	16	30	47	32	37	21	24	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	16	46	93	125	162	183	207	-

RATA 19	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	165.8	145.4	146.8	147.7	148.1	153.2	158.3	168
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-20.4	1.4	0.9	0.4	5.1	5.1	9.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	19.3	11.6	8.2	7.9	4.9	4.8	4.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	0.7	8.4	11.8	12.1	15.1	15.2	15.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	82	83	60	66	54	77	61	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	18	17	40	34	46	23	39	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	18	35	75	109	155	178	217	-

RATA 16	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	154.9	148.1	151	150.3	153	157.9	162.7	174.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-6.8	2.9	-0.7	2.7	4.9	4.8	11.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.1	9.7	10.3	8.5	0	1.4	2.8	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.9	10.3	9.7	11.5	20	18.6	17.2	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	70	66	74	60	95	68	34	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	30	34	26	40	5	32	66	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	30	64	90	130	135	167	233	-

RATA 28	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	150	143	144.2	144.3	145.4	151.4	157.4	161.3
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-7	1.2	0.1	1.1	6	6	3.9
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.6	13.9	13.4	8.5	4.7	5.1	5.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.4	6.1	6.6	11.5	15.3	14.9	14.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	84	91	62	71	86	83	76	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	16	9	38	29	14	17	24	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	16	25	63	92	106	123	147	-

C) GRUPO DE SUCRALOSA

RATA 4	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	137.4	140	138.3	140.2	144.2	148.1	157.8	157.7
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	2.6	-1.7	1.9	4	3.9	9.7	-0.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	12	9.7	8.6	9.7	5.9	2.1	7.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	8	10.3	11.4	10.3	14.1	17.9	12.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	232	75	82	95	74	60	73	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	18	25	18	5	26	40	27	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	18	43	61	66	92	132	159	-

RATA 18	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	135.5	136.8	134.5	135.3	138.3	141.2	149.9	149.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	1.3	-2.3	0.8	3	2.9	8.7	0
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16	14.6	9	6.9	5.2	3.4	7.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4	5.4	11	13.1	14.8	16.6	12.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	238	48	82	71	59	84	75	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	12	52	18	29	41	16	25	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	12	64	82	111	152	168	193	-

RATA 30	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	159	147	143	143.4	145.9	148.3	154.9	158.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-12	-4	0.4	2.5	2.4	6.6	3.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.6	14.2	9.9	8.3	6	3.7	6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.4	5.8	10.1	11.7	14	16.3	14	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	245	75	73	90	63	63	78	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	5	25	27	10	37	37	22	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	5	30	57	67	104	141	163	-

RATA 8	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	155.4	143.5	142.6	143.1	147.2	151.3	158.2	159.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-11.9	-0.9	0.5	4.1	4.1	6.9	1.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.2	10.9	9.67	4.6	2.3	0	5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.8	9.1	10.4	15.4	17.7	20	15	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	244	52	73	80	58	61	75	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	6	48	27	20	42	39	25	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	6	54	81	101	143	182	207	-

RATA 6	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	140.2	143.6	144.1	144.7	148.4	152	159.4	161.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	3.4	0.5	0.6	3.7	3.6	7.4	2.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.7	8.5	7.7	2.9	1.5	0.1	6.3	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.3	11.5	12.3	17.1	18.5	19.9	13.7	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	230	73	78	70	49	82	68	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	20	27	22	30	51	18	32	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	20	47	69	99	150	168	200	-

RATA 22	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	144.9	146.9	145.5	147.8	153	158.2	163.6	169.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	2	-1.4	2.3	5.2	5.2	5.4	5.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.7	10.5	8.2	0	5.5	1.1	3.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.3	9.5	11.8	20	14.5	18.9	16.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	235	82	79	79	83	90	58	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	15	18	21	21	17	10	42	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	15	33	54	75	92	102	144	-

RATA 12	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	166.2	153.7	147.2	147.8	152.4	156.9	162.6	169.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-12.5	-6.5	0.6	4.6	4.5	5.7	6.8
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.7	14.9	9.3	6	4.8	3.5	3.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.3	5.1	10.7	14	15.2	16.5	16.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	242	77	56	89	69	85	58	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	8	23	44	11	31	15	42	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	8	31	75	86	117	132	174	-

RATA 26	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	164.7	151.8	150	150.6	154.2	157.7	165.1	168.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-12.9	-1.8	0.6	3.6	3.5	7.4	3.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.2	10.4	9.2	2.5	2.1	1.6	2.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.8	9.6	10.8	17.5	17.9	18.4	17.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	244	75	55	71	61	59	58	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	6	25	45	29	39	41	42	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	6	31	76	105	144	185	227	-

RATA 24	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	169.4	157	152.5	153.9	159.3	164.7	169.5	173.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-12.4	-4.5	1.4	5.4	5.4	4.8	3.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16	12.9	9.5	4.4	4.3	4.2	5.9	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4	7.1	10.5	15.6	15.7	15.8	14.1	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	247	78	78	66	70	56	78	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	3	22	22	34	30	44	22	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	3	25	47	81	111	155	177	-

RATA 15	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	173.2	154.9	152	153.9	158.9	163.9	172.1	173.3
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-18.3	-2.9	1.9	5	5	8.2	1.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	19.6	10.3	10.3	5.2	3.5	1.8	5.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	0.4	9.7	9.7	14.8	16.5	18.2	14.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	250	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	241	88	86	72	82	79	69	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	9	12	14	28	18	21	31	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	9	21	35	63	81	102	133	-

D) GRUPO DE ASPARTAME

RATA 51	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	145.8	131.9	130.1	132.9	134.4	139.9	146	154.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.9	-1.8	2.8	1.5	5.5	6.1	8.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.3	12.1	7.8	8.5	3.8	3.7	3.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.7	7.9	12.2	11.5	16.2	16.3	16.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	73	65	72	83	74	68	63	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	27	35	28	17	26	32	37	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	27	62	90	107	133	165	202	-

RATA 46	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	150.5	135.4	133.7	138.3	145.9	148	154	161.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-15.1	-1.7	4.6	7.6	2.1	6	7.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	18.1	10.1	4.2	1.6	3.9	2	3.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	1.9	9.9	15.8	18.4	16.1	18	16.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	69	72	71	71	69	65	71	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	31	28	29	29	31	35	29	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	31	59	88	117	148	183	212	-

RATA 44	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	142	131.1	129.2	128.8	131.6	133.3	144.7	142.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-10.9	-1.9	-0.4	2.8	1.7	11.4	-2.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.7	10.8	8.7	8.4	9.2	1.3	3.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.3	9.2	11.3	11.6	10.8	18.7	16.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	83	75	73	81	71	72	67	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	17	25	27	19	29	28	33	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	17	42	69	88	117	145	178	-

RATA 56	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	154.4	139.6	136.7	141	145.4	149.1	154.2	160.1
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-14.8	-2.9	4.3	4.4	3.7	5.1	5.9
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	18.4	11	6	6	4.6	1.5	4.1	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	1.6	9	14	14	15.4	18.5	15.9	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	89	72	78	75	78	72	71	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	11	28	22	25	22	28	29	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	11	39	61	86	108	136	165	-

RATA 55	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	150.1	136.9	135.9	139.9	144.2	148.6	159.6	159.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.2	-1	4	4.3	4.4	11	0.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.7	10.7	4.8	5.8	6.3	1.7	7.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.3	9.3	15.2	14.2	13.7	18.3	12.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	88	72	70	79	75	69	73	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	12	28	30	21	25	31	27	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	12	40	70	91	116	147	174	-

RATA 37	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	146.9	133.8	132.6	133.8	134	137.5	144.7	148.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.1	-1.2	1.2	0.2	3.5	7.2	3.5
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.4	11.9	9.3	10.9	6.2	5.3	6.3	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.6	8.1	10.7	9.1	13.8	14.7	13.7	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	85	77	74	70	78	71	72	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	15	23	26	30	22	29	28	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	15	38	64	94	116	145	173	-

RATA 33	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	147.7	136.6	134.1	136.1	138.8	143.4	149.4	155.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-11.1	-2.5	2	2.7	4.6	6	6.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.8	10.7	6.9	6.8	8	3.5	5.8	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.2	9.3	13.1	13.2	12	16.5	14.2	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	80	71	69	70	71	73	72	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	20	29	31	30	29	27	28	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	20	49	80	110	139	166	194	-

RATA 54	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	151.3	141.7	138.5	141	141.1	143.2	148.6	148.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-9.6	-3.2	2.5	0.1	2.1	5.4	0.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16	10.8	8.7	9.6	8.5	6.2	11.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4	9.2	11.3	10.4	11.5	13.8	8.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	81	71	69	76	73	68	80	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	19	29	31	24	27	32	20	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	19	48	79	103	130	162	182	-

RATA 50	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	152.6	144.2	141.6	142.4	142.1	144.8	152.9	155.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-8.4	-2.6	0.8	-0.3	2.7	8.1	2.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.4	11.2	8.2	8.7	7.9	3.2	8.9	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.6	8.8	11.8	11.3	12.1	16.8	11.1	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	84	78	75	78	78	66	75	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	16	22	25	22	22	34	25	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	16	38	63	85	107	141	166	-

RATA 36	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	158.6	145.1	142.6	144.7	148.3	152	160.4	160.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.5	-2.5	2.1	3.6	3.7	8.4	0.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17	10.8	5.8	5.8	4.6	2.5	7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3	9.2	14.2	14.2	15.4	17.5	13	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	71	69	78	77	74	80	81	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	29	31	22	23	26	20	19	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	29	60	82	105	131	151	170	-

E) GRUPO DE SACARINA

RATA 59	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	152.2	136.7	136.9	135.7	140.9	148.4	156.3	157.3
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-15.5	0.2	-1.2	5.2	7.5	7.9	1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	18.8	9.3	10.1	7.5	5.2	3.3	8.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	1.2	10.7	9.9	12.5	14.8	16.7	11.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	90	69	82	71	69	58	75	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	10	31	18	29	31	42	25	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	10	41	59	88	119	161	186	-

RATA 35	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	147	134.7	133.1	133.5	137.3	143.6	141.8	144
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-12.3	-1.6	0.4	3.8	6.3	-1.8	2.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	12.5	9.1	8.3	5	5.8	11.9	7.8	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	7.5	10.9	11.7	15	14.2	8.1	12.2	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	86	74	87	82	78	69	77	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	14	26	13	18	22	31	23	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	14	40	53	71	93	124	147	-

RATA 32	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	154.2	140.5	138.3	139.6	143.4	147.4	153.7	163.3
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.7	-2.2	1.3	3.8	4	6.3	9.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	10.5	8.8	8	5.6	3.4	6.5	2.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	9.5	11.2	12	14.4	16.6	13.5	17.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	91	75	71	73	73	72	62	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	9	25	29	27	27	28	38	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	9	34	63	90	117	145	183	-

RATA 57	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	152.9	138.6	140.1	138.7	140.8	147.1	146.2	156.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-14.3	1.5	-1.4	2.1	6.3	-0.9	10.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	12.8	10.4	10.7	8.5	2.2	9.2	0.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	7.2	9.6	9.3	11.5	17.8	10.8	19.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	70	72	78	76	74	66	67	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	30	28	22	24	26	34	33	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	30	58	80	104	130	164	197	-

RATA 34	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	156.4	144.4	143.5	146.4	148.5	153.9	158	164.5
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-12	-0.9	2.9	2.1	5.4	4.1	6.5
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	12.4	10.5	7.1	5	6.2	8.2	0	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	7.6	9.5	12.9	15	13.8	11.8	20	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	70	72	83	73	75	72	58	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	30	28	17	27	25	28	42	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	30	58	75	102	127	155	197	-

RATA 42	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	155.4	145.4	143.8	142.6	145.3	152.2	156.7	161.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-10	-1.6	-1.2	2.7	6.9	4.5	5.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	13.6	8.6	8.2	8.8	4.8	2.4	4.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6.4	11.4	11.8	11.2	15.2	17.6	15.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	90	82	79	80	77	72	58	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	10	18	21	20	23	28	42	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	10	28	49	69	92	120	162	-

RATA 40	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	153.1	138.6	137.9	140.2	147.2	156.2	157.7	163.1
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-14.5	-0.7	2.3	7	9	1.5	5.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	13.7	8.1	5.8	4.5	4.1	8.1	1	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6.3	11.9	14.2	15.5	15.9	11.9	19	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	68	70	76	71	70	68	75	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	32	30	24	29	30	32	25	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	32	62	86	115	145	177	202	-

RATA 58	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	161.1	148.1	147.3	149.2	153.4	162.2	164.7	175.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13	-0.8	1.9	4.2	8.8	2.5	11.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	13.2	9.6	5.7	6.7	4.3	7.5	0	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6.8	10.4	14.3	13.3	15.7	12.5	20	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	91	66	82	83	70	54	70	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	9	34	18	17	30	46	30	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	9	43	61	78	108	154	184	-

RATA 52	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	158.5	149.6	149.3	149.1	151.6	157.9	165	170.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-8.9	-0.3	-0.2	2.5	6.3	7.1	5.8
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	12.6	11.8	10	7.5	3.2	0	0	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	7.4	8.2	10	12.5	16.8	20	20	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	89	63	80	76	68	90	61	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	11	37	20	24	32	10	39	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	11	48	68	92	124	134	173	-

RATA 31	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	163.6	149.4	146.2	147.2	150.6	154.8	160.9	165.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-14.2	-3.2	1	3.4	4.2	6.1	4.9
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.1	12.5	7.1	5.5	2.1	0	0	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.9	7.5	12.9	14.5	17.9	20	20	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	86	76	78	78	64	40	53	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	14	24	22	22	36	60	47	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	14	38	60	82	118	178	225	-

F) GRUPO DE ACESULFAME

RATA 43	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	160.8	145.2	145.4	147.2	153	154.1	161.5	168
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-15.6	0.2	1.8	5.8	1.1	7.4	6.5
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.1	7.1	8.1	4.4	9.4	0	6.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.9	12.9	11.9	15.6	10.6	20	17.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	90	80	74	82	82	68	72	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	10	20	26	18	18	32	28	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	10	30	56	74	92	124	152	-

RATA 38	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	152.5	139.2	138.1	137.2	144.2	145.7	150.6	157.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.3	-1.1	-0.9	7	1.5	4.9	7.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.5	8.7	8.7	2.6	7.8	6	8.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.5	11.3	11.3	17.4	12.2	14	15.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	85	81	82	74	68	76	50	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	15	19	18	26	32	24	50	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	15	34	52	78	110	134	184	-

RATA 47	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	155.5	142.9	140.4	140.2	144.5	148.5	152.6	159
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-12.6	-2.5	-0.2	4.3	4	4.1	6.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.5	12.1	8.8	8	8.3	4.4	7.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.5	7.9	11.2	12	11.7	15.6	16.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	88	80	81	78	53	77	72	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	12	20	19	22	47	23	28	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	12	32	51	73	120	143	171	-

RATA 39	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	156.1	140.2	143.3	141.1	143.1	149.7	152.2	160.7
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-15.9	3.1	-2.2	2	6.6	2.5	8.5
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.5	8.1	12	7.3	1.9	4	6.3	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.5	11.9	8	12.7	18.1	16	17.7	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	82	84	85	63	63	77	58	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	18	16	15	37	37	23	42	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	18	34	49	86	123	146	188	-

RATA 48	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	156.5	145.1	145.3	146.7	154.1	158.2	165	168.1
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-11.4	0.2	1.4	7.4	4.1	6.8	3.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16	9.1	5.8	1.5	6.7	3.4	8.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4	10.9	14.2	18.5	13.3	16.6	15.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	86	82	79	83	66	72	58	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	14	18	21	17	34	28	42	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	14	32	53	70	104	132	174	-

RATA 41	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	163.8	146.8	144.5	146.2	149.4	150.5	157.2	164.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-17	-2.3	1.7	3.2	1.1	6.7	7.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	11.6	12	9	2.9	7	0	6.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	8.4	8	11	17.1	13	20	17.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	58	67	80	72	67	65	82	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	42	33	20	28	33	35	18	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	42	75	95	123	156	191	209	-

RATA 49	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	169.3	158	155.3	157.6	162.2	172.4	174	182.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-11.3	-2.7	2.3	4.6	10.2	1.6	8.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.1	9.8	8.7	3.4	0	5	1.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.9	10.2	11.3	16.6	20	15	22.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	89	80	80	56	60	68	70	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	11	20	20	44	40	32	30	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	11	31	51	95	135	167	197	-

RATA 60	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	168.5	154.2	151	148.9	151.6	151.8	156.3	160.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-14.3	-3.2	-2.1	2.7	0.2	4.5	4.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.9	14.5	11.3	9.5	9.1	5.7	9.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.1	5.5	8.7	10.5	10.9	14.3	14.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	89	88	86	74	72	68	69	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	11	12	14	26	28	32	31	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	11	23	37	63	91	123	154	-

RATA 53	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	170.2	151	151.5	153.4	159.1	163.2	170.6	177.3
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-19.2	0.5	1.9	5.7	4.1	7.4	6.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	18.5	12.4	8.4	2.9	4.9	3.1	5.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	1.5	7.6	11.6	17.1	15.1	16.9	18.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	94	70	76	76	57	64	80	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	6	30	24	24	43	36	20	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	6	36	60	84	127	163	183	-

RATA 45	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	168.1	152.5	152.7	158.1	163.4	169.7	176.2	179.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-15.6	0.2	5.4	5.3	6.3	6.5	3.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	24	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.9	11.3	3.6	5.2	4.5	2.3	5.9	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.1	8.7	16.4	14.8	15.5	17.7	18.1	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	100	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	93	84	80	57	80	66	90	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	7	16	20	43	20	34	10	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	7	23	43	86	106	140	150	-

G) GRUPO DE MEZCLA (ACESULFAME Y ASPARTAME)

RATA 72	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	127.7	119.9	121.9	124.9	132.9	137.8	139.3	145.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-7.8	2	3	8	4.9	1.5	6.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15	9.6	12	3.1	6.4	6	4.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5	10.4	8	16.9	13.6	14	15.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	233	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	86	63	75	53	67	233	218	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	14	37	25	47	33	17	15	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	14	51	76	123	156	173	188	-

RATA 62	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	129.4	126	129.9	129.1	135.7	140.1	140.2	143.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-3.4	3.9	-0.8	6.6	4.4	0.1	3.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	11.9	6.4	11.2	0	1.2	0	5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	8.1	13.6	8.8	20	18.8	20	15	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	241	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	69	74	76	68	58	241	218	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	31	26	24	32	42	9	23	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	31	57	81	113	155	164	187	-

RATA 91	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	143.2	132.5	132.7	132	137.4	141.4	142	145.7
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-10.7	0.2	-0.7	5.4	4	0.6	3.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15	9.7	12.1	5.5	8.3	5.4	7.9	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5	10.3	7.9	14.5	11.7	14.6	12.1	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	239	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	83	54	78	64	64	239	224	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	17	46	22	36	36	11	15	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	17	63	85	121	157	168	183	-

RATA 96	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	143.4	134.2	131.6	130	129.4	130.8	131.2	135.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-9.2	-2.6	-1.6	-0.6	1.4	0.4	4.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.8	10	15.2	8.8	11.6	10.3	10	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.2	10	4.8	11.2	8.4	9.7	10	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	236	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	86	66	86	77	57	236	220	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	14	34	14	23	43	14	16	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	14	48	62	85	128	142	158	-

RATA 80	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	147	139.8	140.5	140.6	148	151.7	153.8	157.5
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-7.2	0.7	0.1	7.4	3.7	2.1	3.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.2	9.3	13.6	5.5	6.3	5.5	7.1	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.8	10.7	6.4	14.5	13.7	14.5	12.9	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	227	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	85	54	78	81	64	227	213	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	15	46	22	19	36	23	14	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	15	61	83	102	138	161	175	-

RATA 77	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	145.6	138.2	138.7	137.4	142.6	147.2	148.6	151
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-7.4	0.5	-1.3	5.2	4.6	1.4	2.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.6	8.4	11.7	0	3.4	7.1	6.1	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.4	11.6	8.3	20	16.6	12.9	13.9	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	234	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	83	50	73	52	85	234	218	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	17	50	27	48	15	16	16	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	17	67	94	142	157	173	189	-

RATA 76	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	143.1	135.8	136.8	137.6	143.5	148	151.1	154
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-7.3	1	0.8	5.9	4.5	3.1	2.9
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.5	8.8	14.2	4.7	5.6	5.8	7.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.5	11.2	5.8	15.3	14.4	14.2	12.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	235	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	69	60	55	67	66	235	214	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	31	40	45	33	34	15	21	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	31	71	116	149	183	198	219	-

RATA 71	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	142.1	134.9	136.2	139.9	144	144.4	147.4	153.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-7.2	1.3	3.7	4.1	0.4	3	6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.8	12.5	14.1	8.4	9.3	7.1	9.1	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.2	7.5	5.9	11.6	10.7	12.9	10.9	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	229	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	80	57	73	63	53	229	219	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	20	43	27	37	47	21	10	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	20	63	90	127	174	195	205	-

RATA 74	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	146.4	138	139.7	142.8	149.4	149.9	153.4	155.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-8.4	1.7	3.1	6.6	0.5	3.5	2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.1	11.1	11.4	6.6	8.4	5.2	8.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.9	8.9	8.6	13.4	11.6	14.8	11.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	237	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	60	95	65	71	72	237	214	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	40	5	35	29	28	13	23	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	40	45	80	109	137	150	173	-

RATA 99	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	156.4	147	143.9	144.8	147.1	149.9	153.6	154
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-9.4	-3.1	0.9	2.3	2.8	3.7	0.4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.3	16.1	12.1	4.7	8.1	6.4	9.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.7	3.9	7.9	15.3	11.9	13.6	10.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	100	250	225	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	80	55	72	65	58	225	218	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	20	45	28	35	42	25	7	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	20	65	93	128	170	195	202	-

H) GRUPO DE STEVIA

RATA 85	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	147	136	134.1	136.6	141.4	146	153.6	156.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-11	-1.9	2.5	4.8	4.6	7.6	3.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.7	11	6.2	1.4	2.2	6.6	1.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.3	9	13.8	18.6	17.8	13.4	18.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	239	205	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	50	56	82	74	239	205	175	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	50	44	18	26	11	34	30	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	50	94	112	138	149	183	213	-

RATA 65	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	134.7	124.6	126	131.7	136	139	144.5	149.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-10.1	1.4	5.7	4.3	3	5.5	4.9
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.5	9.5	6.5	6.3	4.9	5.8	5.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.5	10.5	13.5	13.7	15.1	14.2	14.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	229	218	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	68	68	73	73	229	218	202	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	32	32	27	27	21	11	16	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	32	64	91	118	139	150	166	-

RATA 86	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	130.7	133.1	132	139.5	143	146	150.5	158.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	2.4	-1.1	7.5	3.5	3	4.5	7.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	15.3	8.6	3.5	3	4	6.5	1.7	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4.7	11.4	16.5	17	16	13.5	18.3	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	227	213	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	72	83	76	79	227	213	192	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	28	17	24	21	23	14	21	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	28	45	69	90	113	127	148	-

RATA 79	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	149.4	139.7	139.6	146.7	151.4	154.3	162.9	164.7
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-9.7	-0.1	7.1	4.7	2.9	8.6	1.8
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	12.1	8.3	4.7	4.6	1.4	4	4.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	7.9	11.7	15.3	15.4	18.6	16	15.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	236	210	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	82	62	68	75	236	210	190	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	18	38	32	25	14	26	20	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	18	56	88	113	127	153	173	-

RATA 90	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	155.1	140.2	136.9	136.4	139.5	141.5	148.1	147
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-14.9	-3.3	-0.5	3.1	2	6.6	-1.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16	15.4	10.1	6	9.3	5.6	9.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4	4.6	9.9	14	10.7	14.4	10.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	225	216	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	73	67	58	70	225	216	196	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	27	33	42	30	25	9	20	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	27	60	102	132	157	166	186	-

RATA 63	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	145.1	131.5	131.9	135.9	143.8	141	144.3	148.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.6	0.4	4	7.9	-2.8	3.3	4.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16	11.6	6.5	2.7	8.2	6.7	5.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4	8.4	13.5	17.3	11.8	13.3	14.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	231	218	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	70	70	73	84	231	218	192	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	30	30	27	16	19	13	26	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	30	60	87	103	122	135	161	-

RATA 78	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	155.9	144.9	142.3	142.9	145.8	147.3	147.4	152.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-11	-2.6	0.6	2.9	1.5	0.1	5
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.3	9.8	7.7	5.4	7.1	7.5	4.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.7	10.2	12.3	14.6	12.9	12.5	15.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	241	220	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	66	72	65	77	241	220	202	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	34	28	35	23	9	21	18	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	34	62	97	120	129	150	168	-

RATA 88	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	158	143.5	142.5	145.3	148.3	152.4	152.7	158.4
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-14.5	-1	2.8	3	4.1	0.3	5.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.7	12.5	7.5	6.2	4.8	12.7	3.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.3	7.5	12.5	13.8	15.2	7.3	16.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	230	215	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	66	73	79	84	230	215	194	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	34	27	21	16	20	15	21	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	34	61	82	98	118	133	154	-

RATA 83	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	162.1	148.2	145.9	151.5	152.8	156.9	165.6	170.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.9	-2.3	5.6	1.3	4.1	8.7	5
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	13.8	11.2	5.1	6.2	4.4	5.1	4.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6.2	8.8	14.9	13.8	15.6	14.9	15.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	224	209	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	82	52	66	98	224	209	186	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	18	48	34	2	26	15	23	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	18	66	100	102	128	143	166	-

RATA 68	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	160.6	147.6	145.9	152	155.7	160.3	166.3	169.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13	-1.7	6.1	3.7	4.6	6	3.6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	13.6	10.3	2.9	3.7	0	4.6	0.8	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6.4	9.7	17.1	16.3	20	15.4	19.2	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	100	100	250	218	208	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	74	64	72	93	218	208	182	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	26	36	28	7	32	10	26	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	26	62	90	97	129	139	165	-

D) GRUPO DE CONTROL

RATA 89	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	145.7	132.1	131.2	133.9	135.4	140.4	146.7	153
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.6	-0.9	2.7	1.5	5	6.3	6.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.1	12.3	8.6	3.7	7.2	3.6	2.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.9	7.7	11.4	16.3	12.8	16.4	17.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	208	202	164	137	120	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	92	81	202	183	140	116	92	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	8	19	6	19	24	21	28	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	8	27	33	52	76	97	125	-

RATA 69	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	140.6	126	129.3	133.2	136.4	144.8	149.5	157.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-14.6	3.3	3.9	3.2	8.4	4.7	8.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	14.4	7.2	4.4	5.9	4.9	3.8	0	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	5.6	12.8	15.6	14.1	15.1	16.2	20	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	224	202	173	140	105	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	89	73	205	189	150	116	72	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	11	27	19	13	23	24	33	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	11	38	57	70	93	117	150	-

RATA 84	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	156.3	139.8	139.3	142	144.3	149.3	154.6	160.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-16.5	-0.5	2.7	2.3	5	5.3	6.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16.4	10.5	7.2	6	6.2	3.7	3.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3.6	9.5	12.8	14	13.8	16.3	16.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	224	202	178	154	131	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	90	74	206	191	159	136	107	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	10	26	18	11	19	18	24	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	10	36	54	65	84	102	126	-

RATA 73	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	153.7	140.6	141	144.6	146.4	147.4	153.9	160.6
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-13.1	0.4	3.6	1.8	1	6.5	6.7
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	16	10.6	4.5	4.4	12.1	3.8	0	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	4	9.4	15.5	15.6	7.9	16.2	20	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	223	197	167	148	118	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	88	79	204	179	160	116	92	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	12	21	19	18	7	32	26	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	12	33	52	70	77	109	135	-

RATA 75	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	165.3	150.1	149.9	152	155	158.2	159.9	165.9
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-15.2	-0.2	2.1	3	3.2	1.7	6
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.3	9.4	7.7	4.1	7.4	8.4	4.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.7	10.6	12.3	15.9	12.6	11.6	15.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	231	212	186	159	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	90	81	216	200	164	143	80	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	10	19	15	12	22	16	20	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	10	29	44	56	78	94	114	-

RATA 61	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	153.5	140.6	139.4	142.7	143.3	148.9	150.1	152.2
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-12.9	-1.2	3.3	0.6	5.6	1.2	2.1
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17.1	9.4	6.9	4.5	6.1	6.4	6.2	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	2.9	10.6	13.1	15.5	13.9	13.6	13.8	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	223	197	164	124	100	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	88	79	204	194	137	100	69	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	12	21	19	3	27	24	31	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	12	33	52	55	82	106	137	-

RATA 70	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	152.6	143.2	142	144.8	146.1	150.1	156.7	160.7
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-9.4	-1.2	2.8	1.3	4	6.6	4
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	19.6	10	7.5	6.1	8.2	3.4	5.6	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	0.4	10	12.5	13.9	11.8	16.6	14.4	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	226	199	170	142	111	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	96	77	207	181	150	123	88	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	4	23	19	18	20	19	23	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	4	27	46	64	84	103	126	-

RATA 81	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	161.2	143.6	143.5	145.4	147.9	152.9	157.2	161.5
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-17.6	-0.1	1.9	2.5	5	4.3	4.3
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	17	10.8	6.6	5.6	6.5	3.5	3.4	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	3	9.2	13.4	14.4	13.5	16.5	16.6	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	227	208	186	158	128	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	92	88	212	193	170	140	104	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	8	12	15	15	16	18	24	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	8	20	35	50	66	84	108	-

RATA 66	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	162.5	146.7	147.4	150.3	151.9	157.2	165.3	172.5
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-15.8	0.7	2.9	1.6	5.3	8.1	7.2
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	13.5	4.5	3.5	3.1	6.8	3.1	0	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	6.5	15.5	16.5	16.9	13.2	16.9	20	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	223	200	168	134	92	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	91	83	204	186	147	108	58	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	9	17	19	14	21	26	34	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	9	26	45	59	80	106	140	-

RATA 94	DÍA 1	DÍA 2	DÍA 3	DÍA 4	DÍA 5	DÍA 6	DÍA 7	DÍA 8
MASA ESPÉCIMEN (g/días)	176.8	157.2	155.1	155.6	155.5	157.8	161.3	165.8
INCREMENTO DE MASA g (Pdía-Pi)	-	-19.6	-2.1	0.5	-0.1	2.3	3.5	4.5
ALIMENTO INICIAL g(i)	20	20	20	20	20	20	20	-
ALIMENTO FINAL g(f)	19.6	10.4	6.7	8	8.7	4.4	5.5	-
ALIMENTO INGERIDO g(i-f)	0.4	9.6	13.3	12	11.3	15.6	14.5	-
VOLUMEN INICIAL mL (vi)	100	100	230	213	192	164	139	-
VOLUMEN FINAL mL (vf)	93	69	217	201	170	148	115	-
VOLUMEN INGERIDO mL (VI=vi-vf)	7	31	13	12	22	16	24	-
VOLUMEN ACUMULADO mL	7	38	51	63	85	101	125	-

BIBLIOGRAFÍA

Adams, S.H., Stanhope, K.L., Grant, R.W., Cummings, B.P., Havel, P.J. (2008). Metabolic and endocrine profiles in response of fructose and glucose in Rhesus macaques. *Endocrinology*, 149(6), pp. 3002-3008.

Álvarez, M., González, L.C., Gil, M., Fontans, S., Romaní, M., Vigo, E., Mallo, F. (2009). Las hormonas gastrointestinales en el control de la ingesta de alimentos. *Endocrinología y Nutrición*, 56 (6), pp. 317-330.

Brown, R.J., Rother, K.I. (2012). Non-Nutritive sweeteners and their role in the gastrointestinal tract. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 97(8):0000-0000.

Casanueva, E. (2008). Diabetes Mellitus y Nutrición. En: E. Casanueva, Z. Calderón y J. Rodríguez. eds. *Nutriología Médica*. 3ra edición. Querétaro: Editorial Médica Panamericana, pp. 473-500.

Chaudhari, N., Roper, S.D. (2010). The cell biology of taste. *The Journal of Cell Biology*, 190 (3), pp. 285-296.

Chaudhri, O., Small, C., Bloom, S. (2006). Gastrointestinal hormones regulating appetite. *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences*, 361(1471), pp.1187-1209.

De la Higuera, L.M., Valdés, H.S., Soriguer, E.F. (2007). GLP-1 Generalidades e interacción incretinas-nutrientes. *Revista Clínica Española*, 207 (10), pp. 501-504.

DOF. (2009). Modificación del inciso 0, el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana NOM-008-SCFI-2002, Sistema general de unidades de medida. Jueves 24 de septiembre de 2009 DIARIO OFICIAL (Primera Sección). Secretaría de Economía, Poder Ejecutivo Federal. Estados Unidos Mexicanos. México D.F. México.

Elliot, S.S., Keim, N.L., Stern, J.S., Teff, K., Havel, P.J. (2002). Fructose, weight gain and the insulin resistance syndrome. *American Journal Clinical Nutrition*, 76 (5), pp. 911-922.

Fernstrom, J.D., Munger, S.D., Sclafani, A., De Araujo, I.E., Roberts, A., Molinary, S. (2012). Mechanisms for sweetness. *The Journal of Nutrition*, 142, pp. 1134S-1141S.

Fitch, C., Keim K. (2012). Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: Use of nutritive and nonnutritive sweeteners. *Journal of the Academic of Nutrition and Dietetics*, 112(5), pp.739-758.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations - for a world without hunger (2010). [En línea] (Consultado el 11 de Octubre 2012) Disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/index.html#VISUALIZE>

Fujita, Y., Wideman, R.D., Speck, M., Asadi, A., King, D.S., Webber, T.D., Haneda, M., Kieffer, T.J. (2008). Incretin release from gut is acutely enhanced by sugar but not by sweeteners in vivo. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 296, pp. E473-E479.

Guzmán, M.B., Jiménez, D. (2012). Efecto de la ingestión crónica de edulcorantes naturales y artificiales en un modelo animal en la ganancia de masa corporal a lo largo de 270 días. Tesis en proceso, Facultad de Química UNAM, pp. 155-158.

Hansotia, T., Drucker, D.J. (2005). GIP and GLP-1 as incretin hormones: Lessons from single and double incretin receptor knockout mice. *Regulatory Peptides*, 128, pp. 125-134.

Jang, H.J., Kokrashvili, Z., Theodorakis, M.J., Carlson, O.D., Kim, B.J., Zhou, J., Kim, H.H., Xu, X., Chan, S.L., Juhaszova, M., Bernier, M., Mosinger, B., Margolskee, R.F., Egan, J.M. (2007). Gut-expressed gustducin and taste receptors regulate secretion of glucagon-like peptide-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (38), pp. 15069-15074.

JECFA (1993). Evaluación de los riesgos asociados con las sustancias químicas, sweeteners. Dirección electrónica: <http://www.fao.org/ag/agn/jecfa-additives/1993results.html>

Johnson, J.R., Segal, S.M., Sautin, Y., Nakagawa, T., Feig, I.D., Kang, D., Gersch, S.M., Benner, S., Sánchez-Lozada, L. (2007). Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am. J. Clin. Nutr.*, 86, pp. 899-906.

Juul, J., Jesper, G. (2004). Role of incretin hormones in the regulation of insulin secretion in diabetic and nondiabetic humans. *American Journal of Physiology*, 287 (2), pp. E199-E206.

Jürgens, H., Haass, W., Castañeda, T. R., Schürmann, A., Koebnick, C., Dombrowski, F., Otto, B., Nawrocki, A.R., Scherer, P. E., Spranger, J., Ristow, M., Joost, G. H., Havel, P. J., Tschöp, M. H. (2005). Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obesity Research*, 13(7):1146-1156.

Li, X. (2009). T1R receptors mediate mammalian sweet and umami taste. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 90 (S), pp. 733S-737S.

Mace, O.J., Affleck, J., Patel, N., Kellett, G.L. (2007). Sweet taste receptors in rat small intestine stimulate glucose absorption through apical GLUT2. *J. Physiol.*, 582(1), pp. 379-392.

Margolskee, R.F. (2002). Molecular mechanisms of bitter and sweet taste transduction. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 (1), pp. 1-4.

Margolskee, R.F., Dyer, J., Kokrashvili, Z., Salmon, K.H., Ilegems, E., Daly, K., Maillet, E.L., Ninomiya, Y., Mosinger, B., Shirazi-Beechey, S.P. (2007). T1R3 and gustducin in gut sense sugars to regulate expression of Na-glucose cotransporter 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (38), pp. 15075-15080.

Martínez, C., González, E., García, R.S., Salas, G., Constantino-Casas, F., Macías, L., Gracia, I., Tovar, C., Durán-de-Bazúa, C. (2010). Effects on body mass of laboratory rats after ingestion of drinking water with sucrose, fructose, aspartame, and sucralose additives. *The Open Obesity Journal*, 2, pp. 116-124.

Meyers, B. y Brewer, M.S. (2008). Sweet taste in man: a review. *Journal of Food Science*, 73 (6), pp. R81-R90.

Millipore (2012). Metodología para la determinación de la hormona GIP. Bajado de las redes internacionales del Internet con última revisión del 25 de abril del 2012: (Rat Metabolic Magnetic Bead Panel. 96-Well Plate. Cat. # RMHMAG-84K)
[http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/cd8b999110e72b6585257700004bbbf/\\$FILE/RMHMAG-84K.MPX.pdf](http://www.millipore.com/userguides.nsf/a73664f9f981af8c852569b9005b4eee/cd8b999110e72b6585257700004bbbf/$FILE/RMHMAG-84K.MPX.pdf)

O'Brien-Nabors, L. (2012). Low-calorie sweeteners. En: L. O'Brien-Nabors. eds. *Alternative Sweeteners*. 4ta edición. Estados Unidos de América: Editorial CRC Press, pp. 151-196.

Pérez, R. J., Reyes, D. A. (2010). Efecto de la ingestión crónica de edulcorantes naturales y artificiales en un modelo animal en la ganancia de masa corporal. Tesis profesional de Química de Alimentos. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.

Sejrsen, K. (2008). Transport systems in the epithelia of the small and large intestines. En: G. Breves y S. Wolfram. eds. *Ruminant Physiology*. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, pp. 139-154.

Steinert, R., Frey, F., Töpfer, A., Drewe, J., Beglinger, C. (2011). Effects of carbohydrate sugars and artificial sweeteners on appetite and the secretion of gastrointestinal satiety peptides. *British Journal of Nutrition*, 105, pp. 1320–1328.

Torres, N., Tovar, A. (2013). Comunicación Directa en el Departamento de Fisiología de la Nutrición. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán(INCMYNSZ). México, D.F. México.

Urzúa, G.Z. (2011). Efectos crónicos de la cafeína sobre el nivel y tolerancia a la glucosa en ratas sanas y con diabetes mellitus experimental. Tesis de maestría Facultad de Medicina, Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Colima. Colima, Colima, México. pp. 8-9.

Varzakas, T. (2012). Low Calorie Nonnutritive Sweeteners. En: T. Varzakas, A. Labropoulos y S. Anestis. eds. *Sweeteners. Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology*. 1era edición. Estados Unidos de América: Editorial CRC Press, pp. 79-118.

WebAcademia, (2013). De las redes internacionales del internet. http://centrodeartigos.com/articulos-enciclopedicos/article_81256.html

Yang, Q. (2010). Gain weight by “going diet?” Artificial sweeteners and the neurobiology of sugar cravings. *Yale Journal of Biology and Medicine*, 83, pp. 101-108.

Yarmolinsky, D.A., Zuker, C.S., Ryba, N.P. (2009). Review, common sense about taste: from mammals to insects. *Cell*, 139, pp. 234-244.

YSI (2013). Analizador Bioquímico YSI para la determinación de glucosa. De las redes internacionales del Internet: http://biomed.tamu.edu/BioSyM/2700_select_manual.pdf. Fecha de consulta: Febrero 2013

